

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DU PROFIL LIPIDIQUE MATERNEL ET DU DIABÈTE GESTATIONNEL SUR
LES MÉTABOLISMES DU CHOLESTÉROL ET DES LIPIDES DANS LE PLACENTA À
TERME

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

CHARLES MARSEILLE-TREMBLAY

NOVEMBRE 2006

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Christian Tremblay, mon père, décédé tragiquement à la fin de ma maîtrise, pour avoir fortement contribué à faire de moi ce que je suis, merci et je ne t'oublierai jamais.

Dre Julie Lafond et Dre Catherine Mounier, mes codirectrices, pour m'avoir pris sous leurs ailes, pour m'avoir épaulé financièrement et techniquement.

Lucie Simoneau, pour m'avoir permis de passer au travers de plusieurs obstacles pendant la maîtrise, ton support moral et technique a été d'une valeur incalculable.

Dr Georges Daoud, le doyen du laboratoire Lafond, pour ses questionnements lassants, mais utiles! Avec lui, je certifie qu'il est possible de parfaire ses techniques de laboratoire et de progresser au niveau scientifique.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES SYMBOLES	xii
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
RÔLES ET RÉGULATIONS DE LA HMGR ET DE LA FAS DANS LE PLACENTA À	
TERME.....	3
1.1 La grossesse et le placenta	3
1.1.1 Le placenta	3
1.1.2 Effet de la grossesse sur le métabolisme maternel.....	4
1.1.3 Lipoprotéines et les échanges materno-fœtaux de lipides	4
1.1.4 L'indice de masse corporelle pré-grossesse.....	6
1.1.5 Le gain de poids maternel durant la grossesse	6
1.1.6 Complication de la grossesse: le diabète gestationnel	7
1.2 La HMG-CoA réductase	7
1.2.1 L'importance du cholestérol	7
1.2.2 Le rôle de la HMG-CoA reductase dans la synthèse de cholestérol.....	8
1.2.3 Régulation de la HMGR au niveau transcriptionnel	8
1.2.4 Régulation de la HMGR au niveau protéique.....	10
1.2.5 Conclusion sur la régulation de la HMGR.....	10
1.3 La synthétase des acides gras.....	10

1.3.1	L'importance des acides gras	10
1.3.2	Le rôle de la FAS dans la lipogenèse	11
1.3.3	Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par l'insuline.....	12
1.3.4	Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par le glucagon	12
1.3.5	Régulation transcriptionnelle de la FAS par les SREBP	12
1.3.6	Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par les acides gras	13
1.3.7	Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par les LXR.....	13
1.3.8	Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par la T3	14
1.3.9	Conclusion sur la régulation de la FAS	14
1.4	Les SREBP: régulateurs de la transcription de la HMGR et de la FAS	14
1.4.1	Rôle des SREBP.....	14
1.4.2	La famille et les isoformes de SREBP.....	15
1.4.3	Régulation transcriptionnelle des SREBP.....	16
1.4.4	La maturation des protéines SREBP	17
1.4.5	L'influence de l'inflammation sur la maturation des SREBP.....	18
1.4.6	Activité des SREBP sur les promoteurs des gènes cibles	18
1.4.7	Spécificité des SREBP envers les promoteurs des gènes cibles.....	19
1.4.8	L'acétylation stabilise les SREBP dans le noyau	19
1.4.9	Conclusion sur la régulation des SREBP	20
1.5	Buts de la présente recherche.....	21
1.6	Hypothèses de travail	21
1.6.1	Le cholestérol plasmatique total maternel.....	21
1.6.2	Effet de l'IMC maternel pré-grossesse	21
1.6.3	Effet du gain de poids maternel pendant la grossesse	21
1.6.4	L'effet du diabète gestationnel	22

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE COMPLÉMENTAIRE À L'ARTICLE	23
2.1 Critères de classification de l'IMC et du GDP	23

CHAPITRE III

L'ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	24
-----------------------------	----

3.1	Front page	25
3.2	Abstract	26
3.3	Introduction	27
3.4	Materials and methods.....	30
3.5	Results	34
3.6	Discussion	37
3.7	Aknowledgements	42
3.8	References	43
3.9	Figure legends	47
3.10	Tables.....	49
3.11	Figures	50

CHAPITRE IV

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE	54
4.1 Résultats complémentaires à l'article	54

CHAPITRE V

DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE À L'ARTICLE ET CONCLUSION	55
5.1 Discussion complémentaire	55
5.1.1 Importance des métabolismes étudiés dans le placenta.....	55
5.1.2 Avenues sur les rôles placentaires potentiels de SREBP-2 dans le placenta	56
5.1.3 Explications possibles pour le rôle mineur des SREBP-1.....	56
5.1.4 Modulation du cholestérol plasmatique maternel en fonction de l'IMC et du GDP.....	57
5.1.5 Relation entre le cholestérol maternel et l'inflammation.....	57
5.1.6 Le poids des placentas et le diabète gestationnel.....	58
5.1.7 Le GDM et les niveaux circulants de TG	58
5.1.8 Rôle de l'IL-1 β et du TNF- α lors du GDM	59
5.1.9 Inflammation et maturation de SREBP-1 lors du GDM	59
5.1.10 L'augmentation du ratio FC/CE lors du GDM.....	59
5.2 Conclusion.....	60

APPENDICE A	
CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT AU PROJET	63
APPENDICE B	
BIBLIOGRAPHIE	64

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Substrats de produits de la réaction catalysée par la HMGR	8
1.2 Substrats de produits de la réaction catalysée par la FAS	12
3.1 Protein expression of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 in term placentas. The Western blot analyses of HMGR (A), FAS (B), nSREBP-2 (C) and nSREBP-1 (D) were performed on total proteins extracted from placenta of women classified according their plasmatic cholesterol level. Two different groups were formed: one for the Lower Median Cholesterol (LC [(□); n=30]) and another for the Higher Median Cholesterol (HC [(■); n=30]). Representative Western blot are shown below each panel (n=3 for each group). Results are expressed as the mean ± SEM, where * = $P < 0.05$	55
3.2 (A) Correlation between HMGR and nSREBP-2 protein expression in term placentas (LC group [(●); n=30], HC group [(□); n=30]). (B) Quantification of the SREBP-2 mRNA expression in term placentas by real-time PCR for both studied groups: Lower Median Cholesterol (LC group [(□); n=7]) and the Higher Median Cholesterol (HC group [(■); n=12]). Results are expressed as the mean ± SEM, where * = $P < 0.05$. (C) Identification of SREBP-1a and SREBP-1c mRNA expression by PCR in term placentas (n=4)	55
3.3 Correlations of inflammatory cytokines with the different cholesterol fractions in term placentas. Correlations of FC with IL-1β (A) or TNF-α (B), of TC with IL-1β (C) or TNF-α (D), and of CE with IL-1β (E) or TNF-α (F) were performed for both Lower Median Cholesterol (LC [(●); n=30]) and Higher Median Cholesterol (HC [(□); n=29]) women groups. * = $P < 0.05$, *** = $P < 0.001$	56
3.4 Protein expression of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 in term placentas. The Western blot analyses of HMGR (A), FAS (B), nSREBP-2 (C) and nSREBP-1 (D) were performed on total proteins extracted from placenta of women without Gestational Diabetes Mellitus (Non-GDM [(□); n=60]) and of women with Gestational Diabetes Mellitus (GDM [(■); n=7]). Representative Western blot are shown below each panel (n=3 for each group). Results are expressed as the mean ± SEM	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
3.1 General characteristics of the 67 women, newborns and placentas. BMI: body mass index before pregnancy, WG: weight gain during pregnancy. Results are expressed as means \pm SD where [*] = $P < 0.05$ compared with the LC group, and where [§] = $P < 0.05$ compared to the Non-GDM group.....	54
3.2 Maternal and fetal plasmatic lipid concentrations and placental cholesterol tissue content. Results are expressed as means \pm SEM, where ^{***} = $P < 0.001$ compared to the LC group, and where [§] = $P < 0.05$ compared to the Non-GDM group	54
3.3 Inflammatory cytokines content in term placenta. Results are expressed as means \pm SEM, where ^{§§§} = $P < 0.001$ compared to the Non-GDM group .	54
4.1 Niveau protéique relatif de la HMGR, de la nSREBP-2, de la FAS et de la nSREBP-1 dans le placenta humain selon les classifications par l'IMC ou le GDP	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACAT	Acyltransférase acyl-CoA:cholestérol
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
AMPK	Kinase d'AMP
ARC/DRIP	Complexe médiateur des mammifères
ARNm	ARN messenger
bHLH-Zip	« Basic-loop-helix-leucine zipper »
CE	Ester de cholesterol
CEH	Hydrolase d'ester de cholestérol
ChREBP	Protéine liante à l'élément de réponse aux hydrates de carbone
CRE	Élément réponse à l'AMP cyclique
FAS	Synthétase des acides gras
FC	Cholestérol libre
FFA	Acide gras libre
G6PDH	Déshydrogénase glucose-6-phosphate
GAPDH	Glyséraldéhyde-3-phosphate déhydrogenase
GDM	Diabète gestationnel
GDP	Gain de poids
GK	Glucokinase
HC	Cholestérol maternel plasmatique inférieur à la médiane
hCG	Hormone gonadotrophine chorionique humaine
hCT	Hormone thyroïdienne placentaire
HDL	Lipoprotéine de haute densité

HMGR	HMG-CoA réductase
hPL	Hormone placentaire lactogène humaine
HSL	Lipase hormono-sensible
IL-1 β	Interleukine-1 bêta
IMC	Indice de masse corporelle
Insig	Protéine du gène activé par l'insuline
LC	Cholestérol maternel plasmatique inférieur à la médiane
LC-PUFA	Acides gras polyinsaturés à longue chaîne
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDL-R	Récepteur de lipoprotéine de faible densité
LXR	Récepteur X hépatique
LXRE	Élément de réponse au récepteur X hépatique
NF-Y	Facteur nucléaire Y
nSREBP	SREBP mature, nucléaire
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PPAR	Proliférateur de péroxysome alpha
PPRE	Élément de réponse aux proliférateurs de péroxysome
pSREBP	SREBP immature, précurseur
PUFA	Acide gras poly-insaturé
RE	Réticulum endoplasmique
RXR	Récepteur X rétinoïde
S1P	Site 1 protéase
S2P	Site 2 protéase
SCAP	Protéine activatrice du clivage par les stérols

SCD-1	Stéaroyl-CoA désaturase 1
Sp1	Protéine de spécificité 1
SR-BI	Récepteur <i>scavenger</i> de classe B-I
SRE	Élément réponse aux stérols
SREBP	Protéines liant l'élément de réponse aux stérols
SSD	Domaine senseur de stérol
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TC	Cholestérol total
TG	Triglycéride
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale-alpha
TR	Récepteur thyroïde
TRE	Élément de réponse triiodothyronine
USF	Facteur de stimulation en amont
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité

LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
cm	Centimètre
g	Accélération due à la pesanteur (m/s^2)
g	Gramme
h	Heure
kg	Kilogramme
m	Mètre
m^2	Mètre carré
mg	Miligramme
Min	Minute
mM	Milimolaire
nmol	Nanomole

RÉSUMÉ

Le placenta permet les échanges entre la mère et le fœtus tout en assurant le maintien de l'implantation foetale dans l'organisme maternel. De ce fait, le placenta pourrait compenser pour une variation du niveau de lipides maternels circulant en régulant sa propre synthèse de cholestérol et de lipides, afin de protéger le fœtus. La présente étude a été réalisée sur 60 femmes divisées en deux groupes de même taille, en fonction de la médiane de cette population pour la concentration maternelle de cholestérol total plasmatique. Ces femmes ont aussi été classées selon leur indice de masse corporelle pré grossesse et le gain de poids durant la grossesse. De plus, ces mêmes femmes ont servi de groupe contrôle pour 7 femmes atteintes de diabète gestationnel et traitées à l'insuline. Notre hypothèse de départ était qu'une hausse de cholestérol maternel diminuerait la synthèse de cholestérol, mais aussi la synthèse *de novo* de lipides dans le placenta. Un indice de masse corporelle plus grand, diminuerait quant à lui la lipogenèse mais pas la synthèse de cholestérol. Un gain de poids plus élevé devrait diminuer les deux métabolismes, alors que la présence de diabète gestationnel devrait les augmenter dans le placenta. Par immunobuvardages, les effets des différentes concentrations de cholestérol circulant ont été mesurés au niveau du tissu placentaire sur l'expression de la HMGR, de la FAS et des SREBP-1/2, protéines impliquées dans la régulation et le métabolisme du cholestérol et de la lipogenèse. Cette étude montre que l'effet d'une augmentation du cholestérol maternel plasmatique est associé à une augmentation de l'expression de SREBP-2 au niveau placentaire par un mécanisme non identifié. De plus, il semble que la régulation de la lipogenèse dans le placenta est peu dépendante de SREBP-1. Le placenta ne semble pas compenser pour la variation de cholestérol maternel au niveau de la modulation de l'expression de la HMGR et de la FAS. Le fœtus et/ou le transport placentaire semblent pourtant compenser pour ces variations maternelles, puisqu'aucune variation n'a été observée dans la circulation foetale. D'autre part, l'indice de masse corporelle ainsi que le gain de poids n'affectent pas l'expression des protéines ciblées. Finalement, cette étude démontre que, dans le placenta, le diabète gestationnel maternel entraîne un effet semblable à une augmentation de la concentration de cholestérol circulant sur l'expression de la HMGR et de la FAS, effet sans doute causé par une augmentation de la maturation des SREBP-2 en présence d'une élévation des cytokines inflammatoires dans le placenta. En conclusion, il est démontré que l'expression placentaire de SREBP-2 est corrélée positivement au cholestérol circulant maternel, alors que le métabolisme du cholestérol est modifié par le diabète gestationnel.

Mots clés: placenta, cholestérol, lipide, humain, diabète gestationnel

INTRODUCTION

À ce jour, peu d'études ont été effectuées sur l'importance de la synthèse du cholestérol et des acides gras *in situ* dans le placenta humain. L'importance de cet organe clé, mais temporaire, se résume à deux rôles vitaux pour le fœtus. Le placenta favorise les échanges entre la mère et le fœtus tout en permettant le maintien de l'implantation fœtale dans l'environnement maternel par la synthèse d'hormones stéroïdiennes. Compte tenu le rôle central que tient le placenta pendant la grossesse, il est essentiel de déterminer comment cet organe réagit à des variations chez la mère et voir si le placenta peut contribuer à maintenir un environnement foetal stable. Il a été établi que des niveaux circulants élevés de cholestérol chez la mère augmentent les risques de développer l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires plus tard chez l'enfant (Palinski, D'Armiento *et al.* 2001). Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent que le plus important facteur pour expliquer le profil lipidique du nouveau-né est l'environnement gestationnel, et non l'aspect génétique (Bansal, Cruickshank *et al.* 2005). Ainsi, le cholestérol maternel circulant ainsi que le profil lipidique de la mère pourraient affecter le métabolisme des lipides dans le placenta et chez le fœtus à terme. Cette recherche a donc pour but d'éclaircir les mécanismes moléculaires du métabolisme lipidique dans le placenta humain, ce qui pourrait expliquer chez le nouveau-né d'éventuels problèmes au cours de sa vie, comme l'obésité, le diabète, l'hypertension ou les problèmes rénaux. Ce projet évalue ainsi la régulation de la fonction *in situ* de la synthèse de cholestérol et de la lipogenèse dans le placenta. Pour ce faire, la HMG-CoA réductase (HMGR), une enzyme clé de la synthèse de cholestérol, a été mesurée dans le placenta. D'autre part, l'enzyme clé de la lipogenèse, la synthétase des acides gras (FAS), a aussi été analysée. Les principaux régulateurs de l'expression de la HMGR et de la FAS, les protéines liant l'élément de réponse aux stérols (SREBP), ont aussi été étudiées de façon à évaluer l'importance du rôle de ces facteurs de transcription sur les enzymes ciblées dans le placenta, soient la HMGR et la FAS. Cette étude est constituée de 60 femmes, exemptes de médicaments et de maladies autres que le

diabète gestationnel dont le placenta et les échantillons plasmatiques maternels et foetaux à terme étaient disponibles. L'expression des protéines ciblées (la HMGR, la FAS et les SREBP) a été évaluée en relation avec le cholestérol maternel circulant, la présence de diabète gestationnel et le poids maternel par immunobuvardages de type Western. En premier lieu, la littérature pertinente au sujet sera exposée, puis la méthodologie de l'étude sera détaillée. L'article scientifique soumis pour publication suivra, et le mémoire se terminera sur une conclusion complémentaire à la discussion de l'article et faisant état du bilan du travail entrepris pendant ma maîtrise.

CHAPITRE I

RÔLES ET RÉGULATIONS DE LA HMGR ET DE LA FAS DANS LE PLACENTA À TERME

1.1 La grossesse et le placenta

1.1.1 Le placenta

Le placenta constitue l'interface materno-fœtale. Ses principaux rôles sont la protection du fœtus, la fonction d'organe endocrinien pour accommoder la grossesse et celui d'assurer les échanges entre la mère et le fœtus. Au niveau du placenta, les échanges materno-fœtaux sont assurés par un épithélium polarisé qui dérive de la différenciation et de la fusion des cellules cytotrophoblastiques, le syncytiotrophoblaste. Le syncytiotrophoblaste est en contact direct avec le sang maternel (membrane microvillositaire) et le sang fœtal (membrane basale) pour permettre des échanges bidirectionnels entre la mère et son fœtus (Papiernik 1995). Les cytotrophoblastes et les syncytiotrophoblastes sont le siège de la synthèse de nombreuses hormones protéiques, telles que la gonadotrophine chorionique humaine (hCG) qui permet la sécrétion de progestérone et d'oestrogène par le corps jaune au début de la grossesse. La progestérone et l'oestrogène sont nécessaires au maintien et au bon déroulement de la grossesse (Papiernik 1995). À partir de la septième semaine de grossesse, les cellules trophoblastiques prennent le relais du corps jaune en synthétisant d'importantes quantités d'oestrogène et de progestérone à partir du cholestérol et de l'acétate. De plus, le placenta synthétise des hormones qui modifient le métabolisme de la mère, lui permettant d'augmenter ses dépôts de graisse tissulaire et de répondre à la demande du fœtus (King, Butte *et al.* 1994). Ainsi, le placenta effectue la synthèse et la sécrétion de l'hormone placentaire lactogène humaine (hPL), qui favorise l'utilisation des acides gras

comme source d'énergie pour le métabolisme maternel, et l'hormone thyroïdienne placentaire (hCT), qui favorise un bilan calcique positif durant la grossesse (Marieb 1999).

1.1.2 Effet de la grossesse sur le métabolisme maternel

Le principal nutriment transféré par le placenta de la mère vers le fœtus est le glucose, suivi en importance par les acides aminés, les acides gras libres et le glycérol (Hay 1994). Durant la grossesse, le principal substrat impliqué dans la synthèse de glucose chez la mère est le glycérol, ce qui permet au glucose et aux acides aminés d'être disponibles pour le fœtus, suite au transport actif ou par diffusion dans le placenta (Zorzano et Herrera 1986). Au troisième tiers de la grossesse, il se développe une résistance maternelle à l'insuline pour favoriser un haut taux de glucose disponible pour le fœtus dans le sang maternel (Ciaraldi, Kettel *et al.* 1994). Parallèlement, le métabolisme lipidique de la mère passe en phase catabolique avec une augmentation de l'activité lipolytique par la lipase hormono-sensible (HSL), permettant ainsi à la mère d'utiliser les acides gras comme source énergétique principale durant la grossesse (Elliott 1975; Martin-Hidalgo, Holm *et al.* 1994; Williams et Coltart 1978). Concrètement, les concentrations plasmatiques maternelles de cholestérol, de triglycérides et de lipoprotéines augmentent à partir du deuxième tiers de la gestation pour atteindre leur apogée au troisième tiers (Qureshi, Xi *et al.* 1999).

1.1.3 Lipoprotéines et les échanges materno-fœtaux de lipides

Le cholestérol et les lipides exogènes présents dans le placenta proviennent de la circulation maternelle par le biais des lipoprotéines qui sont prélevées par le placenta de façon dépendante ou indépendante de certains récepteurs (Schmid, Davidson *et al.* 2003; Wyne et Woollett 1998). Le cholestérol et les acides gras étant hydrophobes, alors que les circulations maternelles et fœtales sont des environnements hydrophiles, ces molécules doivent circuler en présence de protéines de transport, appelées apolipoprotéines. Les lipoprotéines, c'est-à-dire des apolipoprotéines chargées de

cholestérol et lipides, ne peuvent franchir librement le placenta pour alimenter le fœtus. Elles doivent alors être captées par des récepteurs ou structures spécifiques du côté apical des cellules trophoblastiques. Le placenta exprime une pléiade de ces récepteurs, dont la liste non exhaustive comprend le récepteur de lipoprotéine de faible densité (LDL-R), le récepteur de lipoprotéine de très faible densité (VLDL-R), les récepteurs *scavengers* de classe B (SR-BI) en plus des récepteurs spécifiques pour les apolipoprotéines B et E (Furuhashi, Seo *et al.* 1989; Hatzopoulos, Rigotti *et al.* 1998; Wittmaack, Gafvels *et al.* 1995). Une fois dans le placenta, pour circuler du côté foetal, le cholestérol et les acides gras doivent reformer des lipoprotéines. Les cellules placentaires humaines peuvent synthétiser l'apolipoprotéine A-I et l'apolipoprotéine E qui forment des lipoprotéines de haute densité (HDL), ainsi que l'apolipoprotéine B-100 qui forme des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Madsen, Lindegaard *et al.* 2004; Richardson, Palgunachari *et al.* 1996; Rindler, Traber *et al.* 1991).

Pour que le cholestérol maternel pénètre le placenta, il doit être pris en charge sur la face apicale des trophoblastes, comme indiqué précédemment. Les lipoprotéines internalisées sont ensuite dirigées vers les lysosomes où les esters de cholestérols sont hydrolysés. Les esters de cholestérol peuvent cependant être hydrolysés par d'autres enzymes hors des lysosomes (Hammad, Stefansson *et al.* 1999). Le cholestérol libre peut alors se diriger vers le côté foetal du trophoblaste qui est la membrane basolatérale. L'efflux de cholestérol vers le fœtus peut survenir par trois voies différentes dans le placenta (Cao, Garcia *et al.* 1997; Lafond, Charest *et al.* 1999; Langmann, Klucken *et al.* 1999; Rothblat, de la Llera-Moya *et al.* 1999; Yancey, Bortnick *et al.* 2003). La première voie est la diffusion aqueuse. Pour ce faire, le cholestérol suit le gradient de concentration de façon protéino-indépendante jusqu'aux HDL. La deuxième route implique le récepteur *scavenger* BI (SR-BI) qui permet le transport intracellulaire de cholestérol selon le gradient de concentration vers les HDL. Troisièmement, le cholestérol peut être transporté vers les apolipoprotéines pauvres en cholestérol du côté foetal par l'entremise du transporteur liant la cassette ATP A1 (ABCA1).

L'augmentation de l'activité lipolytique dans les tissus adipeux pendant le troisième tiers de la grossesse assure une libération importante d'acides gras dans la circulation maternelle. Les acides gras libérés, en plus des acides gras dérivant de l'alimentation et de l'augmentation de la production de triglycérides par la lipogenèse hépatique, sont responsables de l'augmentation de la quantité de triacylglycérol dans les lipoprotéines maternelles circulantes (Herrera, Amusquivar *et al.* 2006). Une fois les lipoprotéines réceptionnées par le placenta, les acides gras non estérifiés peuvent se rendre librement au côté foetal des trophoblastes alors que les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont transférés préférentiellement par des protéines liant les acides gras avant l'incorporation dans des lipoprotéines (Herrera, Amusquivar *et al.* 2006).

1.1.4 L'indice de masse corporelle pré-grossesse

Il est reconnu que le poids des femmes est corrélé positivement avec le poids des bébés (Catalano et Kirwan 2001). Aussi, au niveau de la circulation maternelle du dernier trimestre, il a été démontré que les femmes avec un indice de masse corporelle (IMC) pré-grossesse très supérieur à la normale, montrent une augmentation plasmatique de triglycérides, d'insuline, de leptine, de marqueurs inflammatoires, de VLDL, alors qu'une baisse de HDL est remarquée. Cependant, aucune différence dans le cholestérol total circulant et dans les LDL n'a été identifiée (Ramsay, Ferrell *et al.* 2002). Il est maintenant avancé que le poids de la mère et du nouveau-né pourraient affecter la programmation foetale, causant des problèmes futures au cours de la vie adulte (Barker, Eriksson *et al.* 2002).

1.1.5 Le gain de poids maternel durant la grossesse

Le gain de poids (GDP) pendant la grossesse est aussi associé positivement au poids foetal (Lagiou, Tamimi *et al.* 2004). À ce jour, les risques associés au GDP maternel ne sont pas bien caractérisés à la fois pour la mère et le foetus. La plupart des études montrent pourtant des associations entre certains éléments de la nutrition (la cause) et les complications ou les risques observés côtés maternel et foetal. Un exemple frappant est le lien entre l'apport

en cholestérol de la diète maternelle et le risque de développer une maladie cardiovasculaire (Lagiou, Tamimi *et al.* 2004).

1.1.6 Complication de la grossesse: le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est une maladie identifiée comme étant une intolérance au glucose pendant la grossesse. Cette forme de diabète est apparentée au diabète de type 2 et peut annoncer son développement post-partum (Forsbach-Sanchez, Tamez-Perez *et al.* 2005). Lors d'une grossesse normale, une résistance normale à l'insuline se crée, qui est contrée par une augmentation de l'insuline plasmatique maternelle. Néanmoins, 3 à 7% des femmes ne produisent pas assez d'insuline pour outre-passer cette résistance, créant le diabète gestationnel (Kim, Newton *et al.* 2002). Cette résistance pourrait être reliée à une augmentation de la synthèse de progestérone par le placenta. En effet, la progestérone nuit au métabolisme du glucose côté maternel, du moins chez les rats et les souris (Nieuwenhuizen, Schuiling *et al.* 1998; Picard, Wanatabe *et al.* 2002; Sutter-Dub, Kaaya *et al.* 1988). Dans des conditions de diabète gestationnel, les fœtus ont un risque plus élevé d'être affectés par la macrosomie fœtale, le glucose étant plus disponible pour le fœtus. La macrosomie fœtale est associée à des risques plus élevés de traumatismes obstétricaux et de complications métaboliques (Mondestin, Ananth *et al.* 2002). Il a aussi été remarqué que, lors de diabètes gestationnels, il y a une hausse des facteurs inflammatoires plasmatiques et un début de dysfonctionnement vasculaire du côté maternel, ce qui pourrait exposer les femmes ainsi que les fœtus à des risques accrus de maladies cardiovasculaires (Heitritter, Solomon *et al.* 2005). Les diabètes gestationnels peuvent être traités par la prise maternelle d'insuline, ce qui limite la croissance fœtale et les risques associés à la macrosomie (Challier, Hauguel *et al.* 1986).

1.2 La HMG-CoA réductase

1.2.1 L'importance du cholestérol

Le cholestérol est un élément essentiel des membranes plasmiques et est

le précurseur des hormones stéroïdiennes, telles que la progestérone, qui est synthétisée et sécrétée en grandes quantités dans l'environnement maternel par le placenta pour maintenir la grossesse (Tuckey 2005). Même si la synthèse de cholestérol peut avoir lieu dans le placenta, la principale source de cholestérol pour le placenta humain reste celle des LDL maternelles (Archer, Mathur *et al.* 1971; Hellig, Gattereau *et al.* 1970; Mathur, Archer *et al.* 1970).

1.2.2 Le rôle de la HMG-CoA réductase dans la synthèse de cholestérol

La synthèse de cholestérol est catalysée par la HMG-CoA réductase (HMGR), une enzyme du réticulum endoplasmique (RE) d'une taille de 90kDa (888 acides aminés) chez l'humain. C'est l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol et elle effectue la synthèse de mévalonate à partir d'acétate en présence de NADPH (Sever, Yang *et al.* 2003). L'extrémité aminée est hydrophobe et est localisée dans la lumière du RE, alors que le site catalytique de l'enzyme se retrouve du côté C-terminal et est cytosolique (Istvan et Deisenhofer 2000).

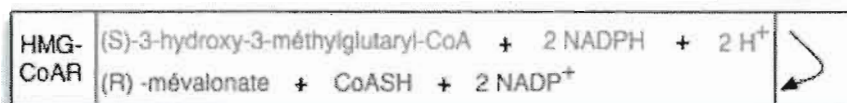


Fig 1.1. Substrats et produits de la réaction catalysée par la HMGR

1.2.3 Régulation de la HMGR au niveau transcriptionnel

L'expression de la HMGR est régulée par les hormones et les nutriments intracellulaires. Chez le rat, le promoteur du gène de la HMGR contient un élément de réponse aux stéroïdes (SRE-1), deux éléments de réponse à l'AMP cyclique (CRE) ainsi que des sites de fixations, à la fois pour la protéine de spécificité 1 (Sp1) et pour le facteur nucléaire Y (NF-Y) (Osborne, Pollock *et al.* 2004). Étant donné l'importance de la HMGR ainsi que de sa présence étendue même chez les eucaryotes unicellulaires, la séquence promotrice de la HMGR humaine, en plus des éléments SRE (Horton, Goldstein *et al.* 2002), Sp1 (Lloyd et Thompson 1995), CRE (Gauthier, Robb *et al.* 1999), doit probablement aussi

contenir l'élément NF-Y, ce qui n'est pas documenté pour l'instant.

L'insuline est une hormone très impliquée dans la régulation transcriptionnelle de la HMGR. L'insuline est sécrétée par le pancréas pour contrer une concentration sanguine de glucose au dessus de la normale. L'insuline circulante se fixe par la suite à son récepteur, localisé sur des tissus spécifiques. La cascade de signaux intracellulaires qui suit la liaison de l'insuline à son récepteur, favorise la captation du glucose pour le stockage et son utilisation pour la synthèse de lipides (Joseph, Laffitte *et al.* 2002). Il a été démontré que l'insuline régule positivement la HMGR via l'élément proximal CRE chez le rat, mais non pas via l'élément SRE (Osborne, Pollock *et al.* 2004). Paradoxalement, l'effet transcriptionnel du glucagon, antagoniste à l'insuline sur la HMGR, agit aussi par l'intermédiaire de l'AMPC sur les CRE (Ness, Zhao *et al.* 1994). Le glucagon, sécrété par le pancréas quand la concentration en glucose dans le sang chute, se lie au récepteur glucagon, déclenchant l'activation de l'adénylate cyclase et une signalisation cellulaire via l'AMPC. Il est suggéré que le glucagon et l'insuline agiraient sur le même site de façon antagoniste, à l'aide de facteurs d'activation spécifiques à chaque hormone (Ness, Zhao *et al.* 1994).

Le niveau intracellulaire de stérols est le principal mécanisme régulant la transcription de HMGR. Cette régulation est exercée via les protéines liant l'élément de réponse aux stérols (SREBP), principalement par l'intermédiaire de l'isoforme SREBP-2 et dans une moindre mesure, SREBP-1a. Lorsque la concentration intracellulaire de stérols diminue, SREBP-2 ou SREBP-1a se lie à l'élément SRE-1 du promoteur de HMGR permettant d'activer la transcription, du moins chez le rat (Sato, Yang *et al.* 1994).

Chez la souris, le proliférateur de péroxysome alpha (PPAR α) module aussi à la hausse l'expression de HMGR en ARN messager. Cependant, aucun élément de réponse aux proliférateurs de péroxysome (PPRE) n'a été identifié pour l'instant dans le promoteur de la HMGR (Le Jossic-Corcos, Pastori *et al.* 2004). Au niveau post-transcriptionnel, la présence de l'hormone triiodothyronine (T3)

augmente la demi-vie des ARN messagers de la HMGR (Simonet et Ness 1988).

1.2.4 Régulation de la HMGR au niveau protéique

Au niveau protéique, la HMGR est régulée par la dégradation et la modulation de son activité enzymatique. La dégradation est causée par une hausse de métabolites dérivés du mévalonate, tel que le cholestérol (Goldstein et Brown 1990; Jingami, Brown *et al.* 1987). En effet, une hausse de ces métabolites dérivés du mévalonate dans la cellule permet à la protéine du gène activé par l'insuline 1 (Insig-1), aussi située dans le RE, de se lier au domaine senseur de stérol (SSD) de la HMGR. Cette liaison favorise une dégradation rapide par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine et donc du système protéasome (Sever, Song *et al.* 2003).

Chez l'humain, il a été démontré que l'activité enzymatique de la HMGR est inhibée par le glucagon via l'activation de la kinase d'AMP (AMPK) qui phosphoryle le résidu sérine situé en position 872 de la HMGR. La fonction de HMGR peut ensuite être rétablie par la déphosphorylation de la sérine 872 effectuée par la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Ching, Kobayashi *et al.* 1997; Omkumar, Darnay *et al.* 1994).

1.2.5 Conclusion sur la régulation de la HMGR

En résumé, une augmentation de l'expression en ARNm de la HMGR est observée en présence d'insuline (CRE) et lors d'une baisse de la concentration en stérols de la cellule (SREBP). L'enzyme est aussi régulée par sa dégradation ainsi que de la perte de son activité enzymatique par phosphorylation.

1.3 La synthétase des acides gras

1.3.1 L'importance des acides gras

Les acides gras sont essentiels au maintien même de l'intégrité cellulaire puisqu'ils composent en grande majorité de la membrane plasmique et des organelles intracellulaires des cellules. De plus, ils sont une importante source

d'énergie pour la cellule lorsqu'ils sont catabolisés par la voie de la bêta oxydation dans les mitochondries (Voet 1998). Au niveau de l'organisme, les acides gras voyagent d'un tissu à l'autre en étant associés aux lipoprotéines plasmatiques sous la forme de triglycérides ou d'acide gras libres. Malgré le fait que le placenta peut synthétiser les acides gras *de novo*, le fœtus dépend des acides gras maternels au début de la gestation. Cette dépendance est réduite graduellement par l'augmentation de la synthèse hépatique fœtale, synthèse produisant la plupart des acides gras nécessaires au fœtus à terme (Van Aerde, Feldman *et al.* 1998).

1.3.2 Le rôle de la FAS dans la lipogenèse

La synthétase des acides gras (FAS) joue un rôle clé dans le métabolisme des acides gras. La FAS catalyse la formation de palmitate en présence de NADPH à partir de malonyl-CoA et de l'acétyl-CoA (Joseph, Laffitte *et al.* 2002; Magana, Koo *et al.* 2000; Moon, Latasa *et al.* 2002). La FAS est une enzyme cytosolique de 272 kDa qui est active sous la forme de complexe homodimérique (Magana et Osborne 1996). La protéine FAS contient trois domaines N-terminaux; la β -cétocoacyl synthase, la malonyl/acétyl transacyclase et la β -hydroxyacyl déshydratase, ainsi que quatre domaines C-terminaux; la énoyl réductase, β -cétocoacyl réductase, la protéine transporteur d'acyl (ACP) et la palmitoyl thioestérase. La production de palmitate implique successivement les différents domaines, les étapes étant décrites dans ce qui suit. Au début de la réaction, l'activité du domaine malonyl/acétyl transacyclase transfère le groupe acétyl et le groupe malonyl vers l'ACP, laissant de côté le groupe CoA. Le domaine β -cétocoacyl synthase permet la réaction condensatoire de l'acétyl-ACP et du malonyl-ACP en acétoacétyl-ACP. Ce dernier produit est réduit en D- β -hydroxybutyryl-ACP par le domaine β -cétocoacyl réductase. C'est alors qu'intervient le domaine β -hydroxyacyl déshydratase pour la production de α , β -trans-buténoyl-ACP. Le domaine énoyl réductase permet la production à ce moment de butyryl-ACP. Le cycle à partir du domaine β -cétocoacyl synthase se répète encore six fois. Le produit de cette boucle se nomme le palmitoyl-ACP qui est soustrait de son groupe ACP par le domaine palmitoyl thioestérase pour former le produit final

de la FAS, le palmitate (Smith, Witkowski *et al.* 2003).

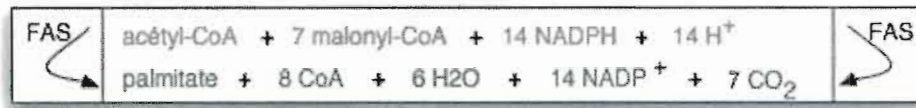


Fig 1.2 Substrats et produits de la réaction catalysée par la FAS

1.3.3 Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par l'insuline

La FAS est régulée principalement au niveau de la transcription (Salles, Sargueil *et al.* 2002). Chez l'humain et les rongeurs, au niveau du promoteur du gène de la FAS, deux SRE, un site de liaison pour Sp1 et NF-Y, un élément de réponse au récepteur X hépatique (LXRE), deux éléments de réponse triiodothyronine (TRE) et une boîte E ont été caractérisés. Ces éléments du promoteur permettent la régulation de l'expression de la FAS en réponse à des stimulations hormonales et nutritionnelles (Magana, Koo *et al.* 2000; Xiong, Chirala *et al.* 1998). L'insuline est dominante sur la régulation transcriptionnelle hépatique de la FAS. Chez l'humain et les rongeurs, les facteurs Sp1, les SREBP et les facteurs de stimulation en amont (USF) se fixent de façon synergique sur le promoteur de la FAS en réponse à l'activation de la cascade de signalisation par l'insuline. Ainsi, les facteurs USF1 et USF2 se lient à la boîte E, les SREBP aux boîtes SRE et Sp1 au site du même nom (Magana, Koo *et al.* 2000).

1.3.4 Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par le glucagon

L'hormone antagoniste de l'insuline, le glucagon, diminue quant à elle l'expression de la FAS. L'augmentation d'AMPc faisant suite à la liaison du glucagon à son récepteur, inhibe la transcription de la FAS par un élément encore inconnu (Foretz, Pacot *et al.* 1999).

1.3.5 Régulation transcriptionnelle de la FAS par les SREBP

Les protéines matures SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2 peuvent activer la transcription de la FAS en réponse à l'insuline ainsi qu'à une baisse intracellulaire

de stérols, permettant leurs liaisons aux éléments SRE en présence de divers cofacteurs tels que Sp1 et NF-Y (Magana, Koo *et al.* 2000). Chez la souris, la SREBP-1a est l'isoforme de SREBP le plus efficace pour l'activation du promoteur de la FAS, suivi de près par la SREBP-2 puis la SREBP-1c. (Moon, Latasa *et al.* 2002).

D'autre part, la transcription de la FAS par SREBP-1c en présence d'insuline est augmentée en réponse à une hausse de glucose intracellulaire (Ishii, Iizuka *et al.* 2004). En effet, l'expression de la glucokinase (GK), qui est nécessaire pour l'induction maximale de la FAS, est dépendante de l'activation par le glucose de la protéine liant les éléments de réponses aux hydrates de carbone (ChREBP) (Dentin, Pegorier *et al.* 2004; Hannah, Ou *et al.* 2001; Ishii, Iizuka *et al.* 2004; Mater, Thelen *et al.* 1999).

1.3.6 Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par les acides gras

Une augmentation des acides gras poly-insaturés (PUFA) inhibe l'expression du gène de la FAS en bloquant le processus de maturation des protéines SREBP-1c et SREBP-1a et en augmentant leur dégradation qu'elles soient immatures ou matures (Jump, Botolin *et al.* 2005; Magana et Osborne 1996; Moon, Latasa *et al.* 2002). Chez le poulet, les acides gras à moyenne chaîne, tels que l'hexanoate et l'octanoate, inhibent aussi la transcription de la FAS (Roncero et Goodridge 1992).

1.3.7 Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par les LXR

Par ailleurs, une augmentation du niveau d'oxystérols augmente la transcription de la FAS par l'activation des récepteurs X hépatiques (LXR). Les oxystérols sont des produits intermédiaires ou finaux du cholestérol générés par oxydation (Bjorkhem et Diczfalusy 2002). La famille des récepteurs LXR comprend deux membres, le LXR α et le LXR β . Ce sont des récepteurs nucléaires qui sont activés par les oxystérols et sont les principaux activateurs des gènes impliqués dans la synthèse de la bile (Repa, Liang *et al.* 2000). Le LXR α est exprimé dans le foie, les tissus adipeux, l'intestin grêle et les macrophages, alors

que le LXR β est exprimé dans tous les tissus (Cagen, Deng *et al.* 2004). L'activité des LXR est limitée par la disponibilité de leurs partenaires d'hétérodimérisation, les récepteurs X rétinoïdes (RXR). Les LXR activés s'associent aux RXR pour augmenter l'expression de la FAS en se liant à l'élément LXRE de son promoteur (Pawar, Botolin *et al.* 2003). L'effet transcriptionnel des LXR est indépendant de celui des SREBP (Joseph, Laffitte *et al.* 2002; Pawar, Botolin *et al.* 2003).

1.3.8 Régulation de la FAS au niveau transcriptionnel par la T3

Une autre hormone, la T3, augmente la transcription de la FAS et ce, de façon synergique avec l'insuline. Effectivement, la présence d'insuline double l'expression de la FAS par la T3 (Stapleton, Mitchell *et al.* 1990) (Mounier, C., résultats non publiés). La T3 est une hormone thyroïdienne synthétisée dans les cellules à partir de la thyroxine (T4) circulante. Elle accélère le métabolisme cellulaire et provoque un effet calorigène (Marieb 1999). La T3 maternelle peut franchir de façon limitée la barrière placentaire pour affecter le métabolisme foetal (Calvo, Obregon *et al.* 1992). Pour augmenter la transcription de la FAS, la T3 doit premièrement lier le récepteur thyroïde (TR). Pour être actif, le récepteur TR doit former un hétérodimère avec le RXR. L'hétérodimère peut alors se lier à l'un des deux éléments TRE du promoteur de la FAS chez l'humain, ce qui va activer la transcription du gène (Xiong, Chirala *et al.* 1998).

1.3.9 Conclusion sur la régulation de la FAS

Ainsi, l'activation de la transcription de la FAS est principalement reliée à la présence d'insuline (Sp1, USF, SREBP), de T3, d'oxystérols (LXR) et de glucose (GK), alors que l'inhibition de la transcription survient en présence de glucagon et d'acides gras et/ou de stérols dans la cellule (SREBP).

1.4 Les SREBP: régulateurs de la transcription de la HMGR et de la FAS

1.4.1 Rôle des SREBP

Les SREBP sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes impliqués, entre autres, dans la voie de la lipogenèse et celle du

métabolisme du cholestérol, les deux voies étudiées dans cette recherche. Ces facteurs de transcription sont exprimés dans le placenta humain et leur rôle sur la modulation de la HMGR et FAS dans ce tissu n'est pas clairement établi dans la littérature actuelle.

1.4.2 La famille et les isoformes de SREBP

Les SREBP font partie de la famille des « *basic-loop-helix-leucine zipper* » (bHLH-Zip) (Brown et Goldstein 1999; Hua, Yokoyama *et al.* 1993). Le motif bHLH-Zip permet aux SREBP matures de pénétrer dans le noyau et de se fixer à l'ADN (Brown et Goldstein 1997). La famille des SREBP est composée de trois principales protéines chez les mammifères: la SREBP-1a, la SREBP-1c et la SREBP-2. Les isoformes SREBP-1a et SREBP-1c sont issus du même gène et générés par épissage alternatif alors que l'isoforme SREBP-2 provient d'un autre gène situé sur un autre chromosome (Osborne 2000). Le domaine bHLH-Zip est identique pour les SREBP-1, alors que celui de la SREBP-2 leur est homologue à 70% (Datta et Osborne 2005). Les ARNm de la SREBP-1c ne diffèrent de ceux de la SREBP-1a qu'au niveau de l'exon terminal en 5'. Effectivement, les deux isoformes SREBP-1 sont issus de différents promoteurs situés sur le même gène, mais ils sont totalement identiques à partir du deuxième exon 5' (Amemiya-Kudo, Shimano *et al.* 2002; Cagen, Deng *et al.* 2004; Hua, Wu *et al.* 1995). La protéine immature ou précurseur des SREBP (pSREBP), d'un poids de 125 kDa, se retrouve dans le réticulum endoplasmique et est inactive. La forme mature (nSREBP) de 60-70 kDa est nucléaire et active (Sato, Yang *et al.* 1994). Dans la plupart des tissus humains, excepté pour la rate et les cellules ayant une haute demande en cholestérol et en lipides insaturés, l'expression de la SREBP-1c est plus importante que celle de la SREBP-1a (Shimomura, Shimano *et al.* 1997). À l'opposé, les cultures primaires et les lignées cellulaires expriment plus de la SREBP-1a que de la SREBP-1c, qu'elles soient d'origine humaine ou de souris (Bennett, Toth *et al.* 2004). La dominance de la forme SREBP-1a, dans les cultures cellulaires, ne serait pas due à la perte de différenciation des cultures primaires ou encore de la croissance rapide des lignées (Shimomura, Shimano *et al.* 1997). La faible expression de SREBP-1c pourrait être reliée à la composition

des nutriments et à l'absence d'hormones dans les milieux de culture, des facteurs qui sont déterminants pour son expression (voir section 1.4.3). Dans le placenta humain, l'expression en ARNm de la SREBP-1c et de la SREBP-1a semble par contre être la même (Felder, Klein *et al.* 2005).

Récemment, une nouvelle forme de SREBP-2 a été identifiée dans les testicules, la SREBP-2gc. L'activité transcriptionnelle de la SREBP-2gc n'est ni régulée par l'insuline, ni par les stérols et elle active la transcription de gènes impliqués dans la spermatogenèse (Wang, Liu *et al.* 2002; Wang, San Agustin *et al.* 2004). Un nouveau transcrit de la SREBP-1 a aussi été identifié, la SREBP-1ac, présente dans tous les tissus testés incluant le placenta. Cet isoforme est aussi indépendant de la régulation par l'insuline et par les stérols et comporte 30 acides aminés de plus que SREBP-1a dans l'exon 5' terminal. Il semble que son expression soit toujours plus faible que celle de SREBP-1a et de SREBP-1c. L'action de la SREBP-1ac n'est pas reliée à l'activation de la transcription, mais bel et bien à son inhibition, en diminuant l'efficacité transcriptionnelle des principaux isoformes de SREBP (Felder, Klein *et al.* 2005).

1.4.3 Régulation transcriptionnelle des SREBP

Le cholestérol et les stérols sont les principaux régulateurs des niveaux d'expression des SREBP. Une hausse intracellulaire de stérols diminue la transcription des SREBP, alors qu'une baisse module à la hausse l'expression des SREBP. De plus, les formes matures de la SREBP-2 et de la SREBP-1c activent leur propre expression par rétro-activation, puisque le promoteur de ces isoformes contient un élément SRE (Cagen, Deng *et al.* 2004; Inoue, Sato *et al.* 1998). La régulation de l'expression des isoformes SREBP-1 est cependant plus complexe, particulièrement pour la SREBP-1c. Des niveaux élevés de PUFA inhibent la transcription de la SREBP-1c ainsi que la maturation protéique des SREBP-1c et de la SREBP-1a, sans pour autant affecter la SREBP-2 (Ou, Tu *et al.* 2001). En effet, les PUFA empêchent l'activation régie par les LXR dont la fixation sur le promoteur est nécessaire à l'initiation de la transcription (Pawar, Botolin *et al.* 2003; Xu, Teran-Garcia *et al.* 2001). D'autre part, les demi-vies des ARNm de

SREBP-1 seraient diminuées substantiellement par les PUFA et ce, de façon plus prononcée pour les SREBP-1c que pour les SREBP-1a. Ces mécanismes moléculaires restent toutefois à identifier (Amemiya-Kudo, Shimano *et al.* 2002; Jump, Botolin *et al.* 2005). Au niveau hormonal, l'insuline active de façon importante l'expression de l'isoforme de la SREBP-1c (Cagen, Deng *et al.* 2004). En effet, l'insuline permet aux coactivateurs LXR, Sp1, NF-Y, et SREBP de se lier aux éléments du promoteur de SREBP-1c pour activer sa transcription (Zhang, Yin *et al.* 2003).

1.4.4 La maturation des protéines SREBP

La SCAP est une protéine du RE qui forme un complexe SCAP/SREBP en se liant au domaine COOH terminal des SREBP (Espenshade, Li *et al.* 2002). Le rôle de la SCAP est d'escorter les SREBP du RE vers l'appareil de Golgi par l'entremise de vésicules de transport tapissées de protéines COP-II (Hua, Nohturfft *et al.* 1996). Ce transport est enclenché lorsqu'il y a une diminution de la concentration de stérols dans la cellule. Effectivement, la SCAP possède un domaine senseur de stérol (SSD) qui, en présence élevée de stérols, entraîne un changement de conformation de la protéine. (Brown, Sun *et al.* 2002; Espenshade, Li *et al.* 2002). Le changement de conformation de la SCAP la rend moins apte à former des complexes avec les SREBP ou à se lier aux protéines COP-II des vésicules de transport (Loewen et Levine 2002; Yabe, Brown *et al.* 2002). D'autre part, une hausse de stérols ou d'oxystérols cause une augmentation des liaisons des Insig aux SCAP, ce qui cause la rétention des complexes SCAP/SREBP dans le RE, pour empêcher la maturation des SREBP (Adams, Reitz *et al.* 2004; Sakai, Duncan *et al.* 1996).

Dans les conditions où le complexe SCAP/SREBP peut être transporté à l'appareil de Golgi, le clivage protéolytique s'enclenche. Le processus s'initie par la reconnaissance du complexe de SCAP/SREBP par la protéase du site 1 (S1P). Si la concentration de stérols est sous la normale, la S1P clive la SREBP en deux entités encore reliées à la membrane (Sakai, Duncan *et al.* 1996). Une fois le premier clivage effectué, la S2P scinde la SREBP au deuxième site de clivage de

façon indépendante de la concentration de stérols (Horton, Bashmakov *et al.* 1998). Le fragment NH₂ terminal, qui résulte des clivages, constitue la forme mature de la SREBP (nSREBP) qui migre alors vers le noyau pour activer la transcription de gènes.

1.4.5 L'influence de l'inflammation sur la maturation des SREBP

La maturation dépendante de la concentration intracellulaire de stérols et d'oxystérols peut cependant être court-circuitée par une augmentation de cytokines inflammatoires dans la cellule. Ce mécanisme, nouvellement identifié dans deux tissus humains différents, peut impliquer l'interleukine-1 bêta (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) (Ruan, Moorhead *et al.* 2004; Ruan, Moorhead *et al.* 2006). Avec l'augmentation de ces cytokines, le clivage de SREBP est induit, augmentant en retour la quantité de cholestérol synthétisée par les enzymes dont l'expression est modulée par les SREBP telle que la HMGR. Le mécanisme est simple: ces cytokines augmentent l'expression en ARNm de la SCAP, ce qui augmente le ratio des protéines SCAP/Insig dans un court laps de temps. Ce faisant, les Insig ne sont pas aussi efficaces pour lier et retenir les complexes SCAP/SREBP dans le RE qui seront alors exportés et clivés dans l'appareil de Golgi (Ruan, Moorhead *et al.* 2004).

1.4.6 Activité des SREBP sur les promoteurs des gènes cibles

Une fois dans le noyau, les isoformes matures (nSREBP) de SREBP-1a et de SREBP-2 interagissent avec les cofacteurs CBP/p300 et le complexe médiateur des mammifères (ARC/DRIP) pour activer de façon plus efficace la transcription des gènes. La nSREBP-1c ne peut pas interagir avec CBP/p300 puisque cet isoforme est tronqué en NH₂, comme indiqué plus tôt (Bennett, Toth *et al.* 2004; Le Jossic-Corcos, Pastori *et al.* 2004; Moon, Latasa *et al.* 2002). Pour activer la transcription de différents promoteurs, la SREBP-1c, un activateur faible, nécessite la présence de plusieurs cofacteurs simultanément tels que la Sp1, le NF-Y, les LXR, les PPAR et les USF (Bennett, Toth *et al.* 2004). Les isoformes nSREBP-1a et nSREBP-2 nécessitent moins de cofacteurs pour se lier aux promoteurs des gènes possédant une boîte SRE (Liang, Yang *et al.* 2002). En

général, l'activité des nSREBP est influencée par la formation possible d'homodimères et d'hétérodimères dans le noyau, les liaisons des dimères s'effectuant par le motif bHLH (Datta et Osborne 2005). Les homodimères nSREBP ont une meilleure activité transcriptionnelle que les monomères correspondants. Néanmoins, les hétérodimères comportant un nSREBP-1c ont une activité transcriptionnelle inférieure à ceux composés de nSREBP-1a et de nSREBP-2 et aux simples monomères. Ainsi, dans les tissus, le ratio nSREBP-1c/nSREBP-a est déterminant sur l'activité des nSREBP-1 (Datta et Osborne 2005).

1.4.7 Spécificité des SREBP envers les promoteurs des gènes cibles

Au niveau de la spécificité d'activation des différents isoformes, les SREBP-1 influencent principalement l'expression de gènes de la lipogenèse tels que Spot 14, ACC, FAS, SCD-1 (stéaroyl-CoA désaturase 1) (Liang, Yang *et al.* 2002). La SREBP-2 régit quant à elle l'expression d'enzymes responsables du métabolisme du cholestérol telles la HMGR, la HMG-CoA synthase et la squalène synthase (Liang, Yang *et al.* 2002). Malgré que seul le premier exon diffère, il y a de grandes différences dans les gènes activés entre les isoformes de SREBP-1 (Liang, Yang *et al.* 2002). Ainsi, la SREBP-1a active tant l'expression de gènes de la voie de la lipogenèse que celle des gènes du métabolisme du cholestérol. La SREBP-1a et la SREBP-1c activent tous deux FAS et ACC, alors que la SREBP-1a ne peut pas initier l'expression de SCD-1 (Bennett, Toth *et al.* 2004). Pour ce qui de la SREBP-2, il influence peu la majorité des gènes de la lipogenèse qui comportent un élément SRE, la FAS étant une exception notable (Horton, Goldstein *et al.* 2002; McPherson et Gauthier 2004). Cependant, les trois isoformes de SREBP peuvent augmenter l'expression de tous les gènes possédant une boîte SRE, s'ils sont surexprimés dans le noyau (Hannah, Ou *et al.* 2001).

1.4.8 L'acétylation stabilise les SREBP dans le noyau

Les cofacteurs CBP/p300 ont par ailleurs des activités intrinsèques acétylases stabilisant les nSREBP (Giandomenico, Simonsson *et al.* 2003). Par

exemple, l'acétylation d'un résidu lysine des nSREBP-1a et des nSREBP-2 par p300 rend ces isoformes moins sensibles à l'ubiquitination. Le résidu lysine acétylé de la SREBP-1a et de la SREBP-2 est aussi présent chez la SREBP-1c, mais pour l'instant, il n'a pas été prouvé que CBP/p300 peut l'acétyler (Hirano, Yoshida *et al.* 2001). Les trois principaux isoformes de nSREBP sont sous le contrôle de la voie de dégradation dépendante du protéasome, et ce, de façon indépendante des niveaux de stérols (Hirano, Yoshida *et al.* 2001). Par ailleurs, l'isoforme SREBP-1c peut être dégradé en présence de PUFA par la même voie du protéasome, cette fois tant pour la forme précurseur que celle mature (Jump, Botolin *et al.* 2005).

1.4.9 Conclusion sur la régulation des SREBP

Les stérols jouent un rôle central dans la modulation de l'expression des SREBP et dans leur processus de maturation. Bien que la SREBP-1c régule spécifiquement la FAS, la SREBP-1a et la SREBP-2 sont plus polyvalentes et augmentent tant l'expression de la HMGR que de la FAS.

1.5 Buts de la présente recherche

Cette recherche vise à évaluer les effets du taux maternel circulant de cholestérol total, du diabète gestationnel, de l'indice de masse corporelle ainsi que du gain de poids de la mère sur le métabolisme du cholestérol et sur le métabolisme des lipides dans le placenta humain à terme.

1.6 Hypothèses de travail

1.6.1 Le cholestérol plasmatique total maternel

Si la captation du cholestérol par le placenta reste identique en présence de niveaux de cholestérol plus élevés du côté maternel, la maturation des SREBP devrait être diminuée, principalement pour SREBP-2, dont la régulation est plus fortement modulée par la concentration cellulaire de stérol que celle des SREBP-1. L'expression de l'ARNm de la HMGR devrait aussi être diminuer de façon corrélée à la maturation de SREBP-2. D'autre part, l'expression protéique de la HMGR devrait être diminuée par dégradation en réponse à cette hausse de cholestérol. Finalement, l'expression de la FAS devrait suivre la diminution de la maturation des trois principales isoformes des SREBP.

1.6.2 Effet de l'IMC maternel pré-grossesse

Si selon l'IMC, le cholestérol plasmatique ne varie pas, mais que les TG plasmatiques sont corrélés positivement, une augmentation de TG circulant chez les femmes d'IMC supérieur devrait diminuer la lipogenèse dans le placenta, mais ne devrait pas affecter le métabolisme du cholestérol.

1.6.3 Effet du gain de poids maternel pendant la grossesse

En supposant qu'avec un gain de poids plus élevé, le cholestérol et les lipides maternels plasmatiques soient plus élevés, la synthèse de cholestérol et la lipogenèse dans le placenta devrait être diminuée.

1.6.4 L'effet du diabète gestationnel

Le diabète gestationnel devrait entraîner dans le placenta une plus grande maturation des SREBP indépendamment du cholestérol suite à une plus grande présence de cytokines inflammatoires. Ainsi, la FAS et la HMGR devraient être plus exprimées dans le placenta en relation avec l'augmentation des nSREBP. De plus, une disponibilité plus importante de glucose maternel circulant pour le placenta devrait résulter en une augmentation de la lipogenèse.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE COMPLÉMENTAIRE À L'ARTICLE

2.1 Critères de classification de l'IMC et du GDP

Les 60 femmes sans diabète gestationnel ont été classées par l'IMC et le GDP pour vérifier leur l'impact sur l'expression de la HMGR, de la FAS et des SREBP. La classification utilisée pour l'IMC et le GDP est celle publiée dans le March of Dimes (Dimes 2005). La classification pour l'IMC (kg/m^2) est: « maigre » (<18.5), « santé » ($18.5-24.9$), « surpoids » ($25-29.9$) et « obésité » (>29.9). Pour les GDP, la classification est relative, c'est à dire que chaque différent IMC pré grossesse se voit attribué un GDP qui lui est relié. Pour la classe d'IMC « maigre », le GDP idéal est de 12.7-18.1kg, pour celle « santé », le GDP idéal est de 11.3-15.9kg, alors que pour celle « surpoids » c'est de 6.8-11.3kg et enfin pour celle « obésité », le GDP idéal est de 6.8kg. Pour les fins de l'étude, lorsque le GDP est dans la plage idéale, il est qualifié de « normal », en dessous, de « inférieur » et au dessus, de « supérieur ».

CHAPITRE III

L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

DANS LE CADRE DE CE CHAPITRE, L'ARTICLE SCIENTIFIQUE EST PRÉSENTÉ DE FAÇON IDENTIQUE À CELUI SOUMIS À LA REVUE BIOLOGY OF REPRODUCTION

Impact of Maternal Cholesterol and Gestational Diabetes Mellitus on Cholesterol and Lipid Metabolism in Human Term Placenta

Short title: *Impact of maternal variation on lipid synthesis in placenta*

Summary sentence: Variation in maternal circulating cholesterol and presence of gestational diabetes mellitus (GDM) affect cholesterol and lipid synthesis in term human placenta, but placenta does not compensate for those variations

Charles Marseille-Tremblay^{1,2}, Jean-Claude Forest³, Yves Giguère³, Catherine Mounier² and Julie Lafond^{1,2,4}

¹Laboratoire de Physiologie materno-fœtale, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8, ²Centre de recherche Biomed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8, ³Hôpital St-François d'Assise (CHUQ), Québec, Québec, Canada, G1L 3L5

⁴To whom correspondence should be addressed:

Julie Lafond PhD ; Laboratoire de Physiologie Materno-Fœtale
Université du Québec à Montréal, Centre de Recherche BioMed
C.P. 8888, Succursale Centre-ville; Montréal, Canada H3C 3P8
Phone: (514) 987 3000 ext 7857; Fax: (514) 987 4647
Email: lafond.julie@uqam.ca

3.2 Abstract

Maternal variations affect fetal outcome, but placental metabolism may help to protect the fetus. The effect of maternal circulating cholesterol level and gestational diabetes mellitus were examined on the placental expression of proteins involved in lipids metabolisms (viz. HMG-CoA reductase, fatty acid synthase and SREBP-1/2). From the 60 non-gestational diabetes women, two groups were formed according to the median concentration of plasmatic total cholesterol. Those women were used as control for the gestational diabetes group, composed of 7 insulin-treated women. Our results show that in placenta, SREBP-2 expression is increased in response to high circulating maternal cholesterol. In addition, we showed that lipid metabolism in placenta is independent of SREBP-1 action. Moreover, placenta does not compensate for variations in maternal plasmatic cholesterol by modulating HMG-CoA reductase and fatty acid synthase proteins expressions. As fetal plasmatic lipids were also not modified, compensation for maternal variations might be achieved by placental transport or by the fetus itself. In addition, we showed that in placenta, gestational diabetes modifies lipid metabolism similarly than increase of maternal plasmatic cholesterol. In gestational diabetes however, the increase in SREBP-2 maturation in placenta is probably related to an elevated level of the interleukin-1 β cytokine in this tissue. Finally, we also demonstrated that placental cholesterol turnover appears to be impaired by gestational diabetes. In conclusion, our study reveals that placental SREBP-2 expression is increased in presence of elevated maternal cholesterol while cholesterol turnover is modified by gestational diabetes.

3.3 Introduction

The human placenta is mainly composed of one syncytiotrophoblast layer, a dominant structure made of multinucleated trophoblasts, acting as a physical barrier between maternal and fetal circulations. In order to supply the fetus with maternal cholesterol and fatty acids, the placenta must receive the vast majority of those nutrients in the form of lipoproteins at the maternal side of the trophoblasts (Woollett 2005). Cholesterol and lipids then cross the placenta by either diffusion or protein-mediated efflux to reach the fetal side of the trophoblasts (Herrera, Amusquivar *et al.* 2006; Woollett 2005). Despite that maternal-derived essential fatty acids are needed to meet the ever-increasing fetal requirements of these over pregnancy (Berghaus, Demmelmair *et al.* 2000), both cholesterol and fatty acids are also produced in placenta and fetal tissues (Shi, Swan *et al.* 1999; Wilentz, Witters *et al.* 2000). Using its unique position, the placenta may compensate for maternal plasmatic cholesterol variations or any abnormalities that may affect the fetus, by modulating the synthesis or the transport of these nutrients. Until today, most studies focused on maternal hypercholesterolemia, which is known to increase the risk of atherosclerosis and cardiovascular diseases in the later life of newborn (Palinski, D'Armiento *et al.* 2001), but the maternal effect of non-pathologic cholesterol variation is not known on the fetus. Since maternal environment is thought to be the principal factor responsible for the lipid profile in newborn (Bansal, Cruickshank *et al.* 2005), even minor variations in cholesterol levels might affect the newborn.

Cholesterol is an essential component of the plasma membranes and a precursor of steroid hormones, such as progesterone in placenta, which is synthesized and secreted in large quantities in order to maintain pregnancy (Tuckey 2005). In humans and baboons, the principal source of cholesterol in placenta is derived from the maternal LDL-cholesterol, but it may be also produced *de novo* (Archer, Mathur *et al.* 1971; Hellig, Gattereau *et al.* 1970; Mathur, Archer *et al.* 1970). The rate-limiting step for cholesterol synthesis is catalyzed by the HMG-CoA reductase (HMGR), an endoplasmic reticulum (ER)

enzyme that produces mevalonate from acetate (Goldstein and Brown 1990). The HMGR expression is mainly regulated at the levels of transcription and post-translation (Goldstein and Brown 1990). HMGR transcription is mainly controlled by the sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2) (Horton, Goldstein *et al.* 2002), while degradation of the HMGR protein is observed in presence of sterols and mevalonate metabolites (Goldstein and Brown 1990; Jingami, Brown *et al.* 1987).

There are 3 main SREBPs isoforms and their pathway are similar and dependant of the intracellular sterol sensing. In presence of high sterol level condition, the SREBP protein forms a complex with the insulin-induced gene (Insig) protein and the sterol cleavage activating protein (SCAP) in the ER. Upon sterol depletion, the Insig is released from the complex, allowing the migration of the SREBP-SCAP complex to the Golgi apparatus. Thereafter, the precursor SREBP (pSREBP) is sequentially cleaved by two proteases. The resulting amino-terminal fraction migrates into the nucleus (nSREBP), where it binds to the sterol regulatory element (SRE) sequences in the promoter of genes like HMGR, leading to increased transcription (Horton, Goldstein *et al.* 2002).

High maternal plasmatic cholesterol can also affect the fatty acid synthesis through the action of SREBP-1a and SREBP-1c. The SREBP-1a is constitutively expressed in various tissues and targets genes implicated in both cholesterol and lipid synthesis, while SREBP-1c is specifically expressed in lipogenic tissues (Horton, Goldstein *et al.* 2002). The SREBP-1c gene expression is modulated by hormones and nutrients as well as by positively by itself (DeBose-Boyd, Ou *et al.* 2001; Janowski, Grogan *et al.* 1999; Repa, Liang *et al.* 2000; Xu, Nakamura *et al.* 1999). The fatty acid synthase (FAS) is one of the key enzymes of lipogenesis, which expression is regulated by SREBPs. It is a cytosolic protein that catalyzes the production of palmitate from acetyl-CoA and malonyl-CoA (Wakil, Stoops *et al.* 1983). While the level of FAS mRNA expression may be up-regulated by all SREBP isoforms, its most potent activators are SREBP-1c and SREBP-2 in tissues (Horton, Goldstein *et al.* 2002). When the cellular level of

sterols and/or poly-unsaturated fatty acids (PUFAs) are decreased in the cell, SREBP-2 and SREBP-1c proteins are cleaved and processed to the nucleus, where they increase FAS gene transcription.

A frequent complication in pregnancy is the gestational diabetes mellitus (GDM), affecting 3 to 7% of women (Kim, Newton *et al.* 2002). This pathology is defined as a glucose intolerance appearing during pregnancy in the mother and it may be associated with undiagnosed type 2 diabetes or risk for developing this metabolic disease after parturition (Forsbach-Sanchez, Tamez-Perez *et al.* 2005). Since the fetuses in GDM are more prone to macrosomia, the lipid metabolism in placenta might also be affected by an elevation of plasmatic glucose level in the mother. Macrosomia represents a risk for obstetric trauma and metabolic complications in the fetus (Mondestin, Ananth *et al.* 2002).

3.4 Materials and Methods

Selected population

Women were recruited at their first prenatal visit, before their tenth week of pregnancy, at the Clinique FIDES or at the St-Luc Hospital (*Centre Hospitalier Universitaire de Montréal*). Each woman filled out an interview-administrated questionnaire after delivery. The questionnaire contained medical history, drinking and smoking habits, as well as general physical features of the women before pregnancy (age, weight, height) and during pregnancy (weight gain, gestational age). The weight and height of the newborn were also registered. Out of 160 women, 67 women were selected from whom completed questionnaires and placental tissues were available when the present study was started. We had rejected women having incomplete dosages values, pathologies (other than GDM) and those who smoked or were under medication (other than insulin for GDM). At delivery, placentas, blood samples from the mother and arterial cord blood samples were collected at the hospital in 10ml Vacutainer tubes containing a polymer gel (BD, Oakville, Canada) and kept on ice.

Group formation

The main criterion of comparison used in the present study was based on the maternal plasmatic total cholesterol (TC) at term. The median of the maternal plasmatic TC at term, excluding women with GDM ($n=7$), was 6.42 mM ($n=60$). Non-GDM women were therefore divided in two groups around the TC median: a Lower median Cholesterol (LC) group ($n=30$) and a Higher median Cholesterol (HC) group ($n=30$).

Plasmatic lipids analysis

Blood samples were centrifuged for 15 min at 3500g and plasma samples were kept at -20°C until analyses. Assay of free fatty acids (FFA) was performed using the Free Fatty Acids, Half Micro Test; Colorimetric assay kit according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science, Laval, Canada). Plasma levels of total cholesterol and triglycerides were quantified using the Unicel

DXC600 Synchron Clinical System (Beckman-Coulter, Mississauga, Canada), at the Clinical Biochemistry Service of the Saint-François d'Assise hospital (Québec, Canada) using enzymatic reactions as described in Deacon and Dawson (Deacon and Dawson 1979) for TC, and Sigma-Aldrich enzymatic reactions kit for TG (St-Louis, USA).

Extraction of total proteins

Placenta samples were extensively washed with a cold saline solution (0.9% NaCl) containing anti-proteases cocktail (1 μ M leupeptin, 1.46 μ M pepstatin and 2 μ g/ml aprotinin) to remove blood from tissue. Thereafter 1g of wet tissue was weighted and homogenized in 3 ml of an ice-cold hypertonic buffer (125 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM CaCl_2 , 1.4% (v/v) Triton X-100, containing the same anti-proteases cocktail described above) using a Polytron PT 3000 (Brinkmann Instruments, Mississauga Canada). Homogenates were kept at 4°C for 30 min and then centrifuged at 10000g for 25 min at 4°C. The supernatants were collected and stored at -80°C until utilization. The protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) reagent assay (Pierce, Brockville, ON, Canada) using the bovine serum albumin (BSA) (Roche Applied Science) as standard.

Western blot analyses

Proteins (150 μ g) were boiled in a sample buffer (4% SDS, 24.8 mM dithiotreitol, 1.2 mM bromophenol blue, 0.25 M sucrose, 2 mM EDTA-2Na and 2% beta-mercaptoethanol) for 5 minutes and separated in 8% SDS-PAGE. Proteins were then electrotransferred to an Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, Mississauga, Canada,) using an electroblotting device (Trans-blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, Richmond, USA) in Towbin buffer (25 mM Tris (pH8.3), 192 mM glycine, 20% methanol) at 20 volts for 40 min. Membranes were incubated overnight at 4°C in Tris buffered saline (TBS-T, 20 mM Tris-base (pH7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 5% of dry skimmed-milk. Anti-SREBP-1, anti-SREBP-2 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), anti-FAS (BD Biosciences, Mississauga, Canada) and anti-HMG-CoA reductase (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, USA) were then

added for 2 h at room temperature. The SREBP-1 (1:1000) and HMG-CoA reductase (1:2500) antibodies were diluted in TBS-T/5% BSA, while the SREBP-2 (1:1000) and FAS (1:2500) antibodies were diluted in TBS-T/5% skimmed-milk. Following three washes using TBS-T, membranes were incubated 1h 30 min at room temperature with their appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (Chemicon, California, USA; 1:2500 for either goat anti-rabbit or of goat anti-mouse) using the same buffer used for the first antibody. The detection was performed using the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Applied Science) and the autoradiographies were analyzed by densitometry using the Density One Software (Bio-Rad). Loading standardization was performed using an anti-GAPDH antibody (Chemicon; 1:5000) on membranes stripped in 25mM glycine-HCL (pH2.0) and 1% SDS at room temperature for 15 min

RNA analysis

Total RNA was extracted from placental tissue using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Canada). The reverse transcription (RT) was performed in a 20 µl reaction containing 2 µg of total RNA using the Omniscript kit (Qiagen) and the Oligo-dT primers (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. The real-time PCRs were performed using the SYBR Premix Ex Taq kit (Takara, Madison, USA) on a LightCycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics, Laval, Canada). The PCR reactions were performed using 0.5 µM of both sense and antisense primers, for 50 cycles to ensure exponential amplification phase of the targeted genes. Real-time PCR were performed on SREBP-2 and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), which was used as a selected reference gene. Primers sequences designed for human SREBP-2 were: (5'-3') (sense) ACCTCATTGTCCACCAGACTG and (antisense) CAGACGCCAAGATGCACAA generating a 171 bp amplicon. Those for human G6PDH were: (5'-3') (sense) TACGGCAACAGATACAAGAACG and (antisense) TCGGCTGCCATAAATATAGG, resulting in a 191 bp amplicon. The relative quantification was performed using the RelQuant software (Roche Diagnostics). PCR reactions of 40 cycles with Taq PCR Core Kit (Qiagen) were also performed to evaluate the presence of both SREBP-1c and SREBP-1a in placentas. Primer

sequences used for these transcription factors were the same as those previously published by Bobard *et al* (Bobard, Hainault *et al.* 2005). Amplicons were migrated on 2% agarose gels using the TAE buffer (40 mM Tris-acetate (pH 8.3), 2 mM EDTA 2Na,) and visualized using ethidium bromide.

Measure of cholesterol in placenta

Total lipids were extracted according to the technique of Bligh and Dyer (Bligh and Dyer 1959). Briefly, 100 mg of wet placental tissue was homogenized in 2 ml of a chloroform-methanol (2:1) solution using a Polytron PT 3000 (Brinkmann Instruments, Canada) and centrifuged at 21 000g for 10 min. Thereafter, the chloroform phase was collected and evaporated under nitrogen. The resulting dried fraction was dissolved in 200 μ l isopropanol containing 10% Triton X-100. The free cholesterol (FC) and total cholesterol (TC) fractions were then quantified using the Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantification Kit (BioVision, Mountain View, USA), according to the manufacturer's instruction. The cholesterol ester (CE) fraction was finally determined according the formula $CE = TC - FC$.

Cytokines quantification

The interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentrations were assayed on the total protein extracted from placental tissues (see previous section) and using the Human IL-1 (IL-1b) ELISA Ready-SET-Go! and Human TNFa (Tumor Necrosis Factor alpha, TNF-alpha, TNF-a) ELISA Ready-SET-Go! kits, respectively (eBioscience, San Diego, USA).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed with the Prism software (version 4.0.2; GraphPad Software, 2004). The unpaired t-test was used to evaluate difference between different groups, while the Pearson's correlation was used to evaluate relationship between two variables of the same population. The criterion of significance was set at $P < 0.05$.

3.5 Results

General population characteristics

Among the population, the pre-pregnancy body mass index (BMI) was the only significantly different characteristic modified between all the previously established groups (Table 3.1). The BMI was decreased in the HC group compared to the LC group ($21.0 \pm 3.3 \text{ kg/m}^2$ versus $23.1 \pm 4.2 \text{ kg/m}^2$, and increased in GDM compared to the Non-GDM group ($28.0 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$ versus $22.0 \pm 3.9 \text{ kg/m}^2$). Of interest to note, insulin-treated GDM women did not gave birth to heavier babies compared to Non-GDM women.

Analysis of lipid content in women plasma at term, in newborn and in placenta

As depicted in Table 3.2, a significant difference was observed between the maternal plasmatic level of TC between the HC and the LC groups ($7.72 \pm 0.17 \text{ mM}$ versus $5.52 \pm 0.13 \text{ mM}$). The maternal TG and FFA levels are also increased in the HC group compared to the LC group (TG: $3.27 \pm 0.22 \text{ mM}$ versus $2.69 \pm 0.19 \text{ mM}$ and FFA: $0.73 \pm 0.06 \text{ mM}$ versus $0.60 \pm 0.06 \text{ mM}$). However, the modification of maternal cholesterol did not affect the levels of plasmatic lipids in newborn, as well as the placental cholesterol content (FC, TC and CE). The presence of maternal GDM did not modify the levels of both maternal and newborn plasmatic lipids. However, GDM increased placental FC content in the Non-GDM group ($9.71 \pm 0.99 \text{ mM}$ in GDM versus $8.18 \pm 0.23 \text{ mM}$), while the CE appeared to be decreased in this group ($1.31 \pm 0.30 \text{ nmol/mg}$ tissue in GDM versus $1.72 \pm 0.14 \text{ nmol/mg}$ tissue).

Impact of maternal TC on HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 proteins expressions in placenta at term

The protein expression level of HMGR in placenta was not affected by the change in the maternal TC level (Fig. 3.1A), while the protein level of FAS was increased with a higher maternal plasmatic TC (Fig. 3.1B). The nSREBP-2 protein expression was also increased in the same condition, in correlation with the

increased in the level of FAS (Fig. 3.1C) but the level of nSREBP-1 protein expression was unaffected (Fig. 3.1D).

To evaluate if nSREBP-2 plays a role in modulating HMGR expression despite a different expression pattern in presence of changes in plasmatic maternal TC, a correlation analysis was performed. This analysis revealed that the level of nSREBP-2 is positively correlated with the level of HMGR in both LC and HC groups (Fig. 3.2A) despite the fact that variation in plasmatic maternal TC had an opposite effect on the expressions of nSREBP-2 and HMGR. Since the level of nSREBP-2 protein is increased in the HC group, we also evaluated its transcription level, to know whether the observed increase was related to an elevation in mRNA expression or to a change in the cleavage rate of the immature protein. As showed in Fig. 3.2B, increase in maternal TC did not influence the mRNA expression level of SREBP-2. As our analysis does not revealed any changes in the SREBP1 protien expression and as the antibodies used in the study were not specific of one isoform, we evaluated the presence of both SREBP-1c and SREBP-1a in placenta using real time PCR. Our analysis demonstrated that both SREBP-1c and SREBP-1a isoforms are expressed in this tissue (Fig. 3.2C).

In order to evaluate whether the pre-pregnancy BMI or the weight gain (WG) during pregnancy may affect the protein expression levels of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 in placenta, Western blot analyses were performed on placental samples in BMI and WG groups classified according to the "March of Dimes, Birth Defects Foundation" (Dimes 2005). No differences in correlation with the BMI or the WG were detected for all the proteins tested (*data not shown*)

Level of inflammatory cytokines in placenta at term

As cytokines may have a role in modulating the expression proteins involved in cholesterol and lipid metabolism, the quantification of the two major inflammatory cytokines was performed in placenta. Both targeted cytokines are

highly expressed in term placenta, but IL-1 β appeared to be the dominant cytokine in placenta, since its concentration represented twice the expression of TNF- α (Table 3.3). Modulation of circulating level of maternal TC did not affect the cytokines levels in placenta. However, the GDM group showed a much higher cytokines level compared to the Non-GDM group. The IL-1 β cytokine content was increased by 79% (286.2 ± 63.2 pg/g tissue in the GDM group *versus* 159.8 ± 10.4 pg/g tissue in the Non-GDM group) while the TNF- α level was increased by 57% (95.8 ± 14.4 pg/g tissue in the GDM group *versus* 61.2 ± 2.4 pg/g tissue in the Non-GDM group). Cytokines seems to affect the cholesterol metabolism in placenta, as elevated IL-1 β were correlated to a lower placental FC concentration (Fig. 3.3A and Fig. 3.3B) and a higher CE concentration ($P=0.0615$; Fig. 3.3E). In addition to being the most expressed cytokine, the IL-1 β expression was more correlated with the level of cholesterol content in placenta than the level of TNF- α (Fig. 3.3A).

Impact of GDM on HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 proteins expressions in placenta at term

The protein expression levels of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 were subsequently evaluated in GDM and Non-GDM groups (Fig. 3.4). Expression levels of these proteins were not significantly affected by GDM, but their expression pattern appears to be similar in response to changes in maternal plasmatic TC (compared HC and LC groups in Fig. 1). As in the HC group, both FAS and nSREBP-2 showed tendencies of an increase in the GDM group compared to the Non-GDM group (Fig. 3.4B, Fig. 3.4C).

Taken together, higher maternal plasmatic lipids increased placental protein expressions of FAS and nSREBP-2, while HMGR and nSREBP-1 expressions did not vary. Similar level of proteins modulations were also observed in the presence of GDM. Finally, we also showed that GDM increases the level of both FC and cytokines in placenta, that may have an important impact on the fetal development.

3.6 Discussion

Our study has showed that most of the population characteristics did not vary in women having high circulating TC and in those having an insulin-treated GDM. A notable exception is however observed for the BMI before pregnancy. While a higher maternal TC showed a tendency of plasmatic lipids increases in the mother, the newborn values did not vary. We also showed that the presence of GDM mostly increased the FC content in placenta, while circulating lipids in newborn remained intact. In addition, our study reveals that maternal level of TC increased the FAS and nSREBP-2 expressions, while it left the expression of HMGR and nSREBP-1 stable. The GDM appears to affect the expression of those proteins in the same way than the maternal TC, although it was not significant. Finally, we demonstrated that placentas showed higher inflammation cytokines levels as well as a higher FC content in women with GDM.

Surprisingly, our study reveals that increase in maternal plasmatic cholesterol levels has an opposite effect on the level of HMGR and nSREBP-2 protein expressions while a positive correlation of both protein levels is observed in placenta. As suggested by a previous study, this may be explained by the fact that a higher HMGR mRNA expression induced by nSREBP-2, can be neutralized by a higher HMGR protein degradation in the tissue in response to increased sterol concentrations (Sever, Song *et al.* 2003).

Our data also suggests that the cleavage rate of the immature SREBP-2 protein may be increased in the presence of elevated maternal TC level, as the nSREBP-2 protein content is increased, while the mRNA expression remained constant. However, elevation of the SREBP-2 expression in response to increase in plasmatic maternal cholesterol is puzzling. We therefore decided to explore two possibilities. We first evaluated if the SREBP-2 maturation was influenced by changes in concentration of placental cholesterol rather than by the maternal level. As showed in Table 2, our results did not reveal any difference in the tissue content. The second possibility investigated was related to the level of

inflammatory cytokines in placenta. Two previous published studies showed that a high level of inflammatory cytokines leads to an increase in SREBP-2 maturation through the activation of SCAP transcription, which in turn increases the SCAP/Insig ratio in the ER, leading to augmentation of the cleavage rate of SREBP-2 in the Golgi (Ruan, Moorhead *et al.* 2004; Ruan, Moorhead *et al.* 2006). However, the level of inflammatory cytokines in placental tissue does not correlate with the level of SREBP-2 cleavage in Non-GDM women. A possible explanation will be that the cleavage of SREBP-2 is influenced by a specific localization of the protein in the ER. A previous study has in fact demonstrated that the amount of CE in the smooth ER fraction, but not the amount of total CE in the cell, influences the retention of SREBP-2 in the ER (Iddon, Wilkinson *et al.* 2001). Finally, another possibility will be that the presence of a higher concentration of nSREBP-2 in placenta may help to protect the fetus from the variation of maternal cholesterol availability resulting in a decrease of placental expression of the ATP-binding cassette A1 (ABCA1) and therefore inducing a reduction of the intracellular cholesterol transport (Zeng, Liao *et al.* 2004). However, the precise mechanism involved in the increase of the nSREBP-2 expression in presence of changes in maternal TC remains to be explored.

FAS expression is mainly regulated at the transcriptional level (Salles, Sargueil *et al.* 2002). Therefore, the increase in the nSREBP-2 levels in placenta, a potent transcriptional activator of FAS (Horton, Goldstein *et al.* 2002), might explain the augmentation of the FAS protein expression observed in the HC women. However, despite this augmentation, the TG and the FFA levels do not vary in the fetal circulation. This suggests that lipogenesis in fetal tissues and/or placental fatty acid transport are modified by elevation of plasmatic cholesterol in the mother.

In regard to our results, SREBP-1 does not appear to play an important role in lipids homeostasis in placenta, even though it has been described as the key regulator of lipogenesis (Horton, Goldstein *et al.* 2002). This may be attributed to a similar level of expression of SREBP-1a and SREBP-1c in placenta

(Felder, Klein *et al.* 2005). Indeed, a high proportion of SREBP-1 heterodimers is often associated with a decrease in their transcriptional activity, especially compared to SREBP-1 monomers and homodimers (Datta and Osborne 2005). In placenta, SREBP-1c transcriptional activity may be also impaired by the fact that very small amount of maternal insulin crosses the placental barrier (Kim, Newton *et al.* 2002), an hormone needed to recruit the SREBP-1c coactivators on the promoters of targeted genes (Cagen, Deng *et al.* 2004; Magana, Koo *et al.* 2000). Moreover, low expression level of insulin in placenta also leads to a higher expression of the Insig-2 protein, an Insig isoform that favors the retention of the SREBP-1c in the ER (Yabe, Komuro *et al.* 2003).

Another important finding in our study is that the effect of GDM on the lipid metabolism is similar to the effect of a high maternal circulating TC on the modulation of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 protein expressions. The effect of GDM cannot be attributed to an increase of TC, as TC concentrations are the same in both GDM and Non-GDM groups. Furthermore, the effect of insulin intake by the women with GDM can be ruled out since the hormone does not cross the placenta. Thus, the GDM impact may be attributed to factors linked to the maternal inflammation status, since an increase of inflammatory markers are observed in the maternal blood of women with GDM (Heitritter, Solomon *et al.* 2005). In agreement with this observation, our results showed that the placentas of the GDM group have much higher inflammatory cytokines concentrations than those of the Non-GDM group. This is especially observed for the IL-1 β , a cytokine associated with the risk of developing type 2 diabetes (Spranger, Kroke *et al.* 2003). We also showed that a higher cytokines content can increase the level of cholesterol-independent SREBP maturation, in agreement with a previous report (Ruan, Moorhead *et al.* 2004; Ruan, Moorhead *et al.* 2006). Taken together, this mechanism may explain the tendency towards an increase of the nSREBP-2 protein in placenta of GDM women and the related increase of the FAS protein level. Finally, the level of HMGR protein expression was still unchanged, probably reflecting a higher degradation rate of the enzyme in presence of an increased placental FC content in GDM women.

Surprisingly, elevated concentrations of inflammatory cytokines lead to an increase of the FC content in GDM, whereas a previous study has reported that elevated IL-1 β increased the content of CE in vascular smooth muscle cell culture (Ruan, Moorhead *et al.* 2006). However, in Non-GDM placentas, the concentration of the IL-1 β cytokine was positively correlated with the content of CE. Thus, our results may suggest that cholesterol turnover is impaired in women with GDM. The shift towards a higher FC and a lower CE content observed in GDM, despite a higher inflammation status, is probably the result of a modulation in the activity or expression of key enzymes involved in the FC/CE turnover, such as acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT), involved in the esterification of FC and/or the cholesterol ester hydrolase (CEH), involved in the hydrolysis of CE. Supporting this hypothesis, it has been shown that the placental synthesis of progesterone and oestradiol, two important hormones in maintaining pregnancy and which synthesis is dependant of FC content (Shi, Swan *et al.* 1999), decrease ACAT activity in placenta (Simpson and Burkhart 1980). In addition, it has been suggested that a higher progesterone synthesis by the placenta might be associated with an increasing risk of GDM (Branisteanu and Mathieu 2003). In fact, secreted progesterone increases maternal insulin resistance by multiple mode of actions, such as impairing glucose metabolism in rats and mice (Nieuwenhuizen, Schuiling *et al.* 1998; Picard, Wanatabe *et al.* 2002; Sutter-Dub, Kaaya *et al.* 1988). Thus, our present study suggests that in the GDM women group, an increase in FC concentration results to ACAT inhibition in response to a high progesterone level. However, the role of GDM on cholesterol metabolism remains to be elucidated necessitating a more precise study in both animal and human.

Of particular mention, our data showed that pre-pregnancy BMI was decreased in presence of elevation of plasmatic maternal TC. However, changes in BMI does not seem to modify the levels of the targeted proteins expressed in placenta. This decrease in BMI is rather surprising, as previous studies reported that BMI does not modify the level of circulating maternal TC (Ramsay, Ferrell *et*

et al. 2002; Silliman and Kretchmer 1995) despite a normal BMI in women with GDM (Forsbach, Contreras-Soto *et al.* 1988). Of interest, our particular study showed that babies delivered under GDM were of normal weight, probably resulting of maternal insulin intake in the last third of pregnancy (Challier, Hauguel *et al.* 1986).

In conclusion, our present study showed that SREBP-2 expression is modulated in placenta in response to changes in circulating level of cholesterol. Our data also suggests that *de novo* lipid synthesis is independent of SREBP-1 expression. In addition, lipid and cholesterol metabolisms in placenta do not seem to be able to compensate for the variation of maternal circulating lipids. The absence of variation observed in fetal plasmatic lipids may be related to a modulation of placental transport and/or fetal metabolism. However, this mechanism needs to be investigated more closely, as it might be linked to an increasing risk of developing cardiovascular diseases and diabetes in the later life of the newborn. We also showed that GDM affects lipid metabolism in placenta, probably as a result of an increase in inflammatory cytokines content, correlating with the increase in maturation of the SREBP-2 protein. In addition, progesterone synthesis in placenta of women with GDM needs to be studied, as our study suggests that progesterone may be responsible for changes in cholesterol turnover in placenta.

3.7 Acknowledgements

We are grateful to the St-Luc Hospital nurses and employees for their support. This research is granted by the CIHR (Canadian Institutes of Health research).

3.8 References

- Archer, D. F., R. S. Mathur, N. Wiqvist and E. Diczfalussy. 1971. «Quantitative assessment of the de novo sterol and steroid synthesis in the human foeto-placental unit. 2. Synthesis and secretion of steroids and steroid sulphates by the midgestation foetus». *Acta Endocrinol (Copenh)*, Vol. 66(4), p. 666-678.
- Bansal, N., J. K. Cruickshank, P. McElduff and P. N. Durrington. 2005. «Cord blood lipoproteins and prenatal influences». *Curr Opin Lipidol*, Vol. 16(4), p. 400-408.
- Berghaus, T. M., H. Demmelmair and B. Koletzko. 2000. «Essential fatty acids and their long-chain polyunsaturated metabolites in maternal and cord plasma triglycerides during late gestation». *Biol Neonate*, Vol. 77(2), p. 96-100.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. «A rapid method of total lipid extraction and purification». *Can J Biochem Physiol*, Vol. 37(8), p. 911-917.
- Bobard, A., I. Hainault, P. Ferre, F. Foufelle and P. Bossard. 2005. «Differential regulation of sterol regulatory element-binding protein 1c transcriptional activity by insulin and liver X receptor during liver development». *J Biol Chem*, Vol. 280(1), p. 199-206.
- Branisteanu, D. D. and C. Mathieu. 2003. «Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty?». *Trends Endocrinol Metab*, Vol. 14(2), p. 54-56.
- Cagen, L. M., X. Deng, H. G. Wilcox, E. A. Park, R. Raghov and M. B. Elam. 2004. «Insulin activates the rat sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1, and NF-Y cis-acting elements». *Biochem J*, Vol. Pt p.
- Challier, J. C., S. Hauguel and V. Desmaizieres. 1986. «Effect of insulin on glucose uptake and metabolism in the human placenta». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 62(5), p. 803-807.
- Datta, S. and T. F. Osborne. 2005. «Activation domains from both monomers contribute to transcriptional stimulation by sterol regulatory element-binding protein dimers». *J Biol Chem*, Vol. 280(5), p. 3338-3345.
- Deacon, A. C. and P. J. Dawson. 1979. «Enzymic assay of total cholesterol involving chemical or enzymic hydrolysis--a comparison of methods». *Clin Chem*, Vol. 25(6), p. 976-984.
- DeBose-Boyd, R. A., J. Ou, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2001. «Expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA in rat hepatoma cells requires endogenous LXR ligands». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98(4), p. 1477-1482.
- Dimes, M. o. (2005). Maternal Obesity and Pregnancy: Weight Matters.
- Felder, T. K., K. Klein, W. Patsch and H. Oberkofler. 2005. «A novel SREBP-1 splice variant: tissue abundance and transactivation potency». *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1731(1), p. 41-47.
- Forsbach, G., J. J. Contreras-Soto, G. Fong, G. Flores and O. Moreno. 1988. «Prevalence of gestational diabetes and macrosomic newborns in a Mexican population». *Diabetes Care*, Vol. 11(3), p. 235-238.

- Forsbach-Sanchez, G., H. E. Tamez-Perez and J. Vazquez-Lara. 2005. «Diabetes and pregnancy». *Arch Med Res*, Vol. 36(3), p. 291-299.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown. 1990. «Regulation of the mevalonate pathway». *Nature*, Vol. 343(6257), p. 425-430.
- Heitritter, S. M., C. G. Solomon, G. F. Mitchell, N. Skali-Ounis and E. W. Seely. 2005. «Subclinical inflammation and vascular dysfunction in women with previous gestational diabetes mellitus». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 90(7), p. 3983-3988.
- Hellig, H., D. Gattereau, Y. Lefebvre and E. Bolte. 1970. «Steroid production from plasma cholesterol. I. Conversion of plasma cholesterol to placental progesterone in humans». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 30(5), p. 624-631.
- Herrera, E., E. Amusquivar, I. Lopez-Soldado and H. Ortega. 2006. «Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer». *Horm Res*, Vol. 65 Suppl 3 p. 59-64.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2002. «SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver». *J Clin Invest*, Vol. 109(9), p. 1125-1131.
- Iddon, C. R., J. Wilkinson, A. J. Bennett, J. Bennett, A. M. Salter and J. A. Higgins. 2001. «A role for smooth endoplasmic reticulum membrane cholesterol ester in determining the intracellular location and regulation of sterol-regulatory-element-binding protein-2». *Biochem J*, Vol. 358(Pt 2), p. 415-422.
- Janowski, B. A., M. J. Grogan, S. A. Jones, G. B. Wisely, S. A. Kliewer, E. J. Corey and D. J. Mangelsdorf. 1999. «Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96(1), p. 266-271.
- Jingami, H., M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. G. Anderson and K. L. Luskey. 1987. «Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum». *J Cell Biol*, Vol. 104(6), p. 1693-1704.
- Kim, C., K. M. Newton and R. H. Knopp. 2002. «Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review». *Diabetes Care*, Vol. 25(10), p. 1862-1868.
- Magana, M. M., S. H. Koo, H. C. Towle and T. F. Osborne. 2000. «Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase». *J Biol Chem*, Vol. 275(7), p. 4726-4733.
- Mathur, R. S., D. F. Archer, N. Wiqvist and E. Diczfalussy. 1970. «Quantitative assessment of the de novo sterol and steroid synthesis in the human foeto-placental unit. I. Synthesis and secretion of cholesterol and cholesterol sulphate». *Acta Endocrinol (Copenh)*, Vol. 65(4), p. 663-674.
- Mondestin, M. A., C. V. Ananth, J. C. Smulian and A. M. Vintzileos. 2002. «Birth weight and fetal death in the United States: the effect of maternal diabetes during pregnancy». *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 187(4), p. 922-926.
- Nieuwenhuizen, A. G., G. A. Schuiling, L. G. Hilbrands, E. M. Bisschop and T. R.

- Koiter. 1998. «Proliferation of pancreatic islet-cells in cyclic and pregnant rats after treatment with progesterone». *Horm Metab Res*, Vol. 30(11), p. 649-655.
- Palinski, W., F. P. D'Armiento, J. L. Witztum, F. de Nigris, F. Casanada, M. Condorelli, M. Silvestre and C. Napoli. 2001. «Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits». *Circ Res*, Vol. 89(11), p. 991-996.
- Picard, F., M. Wanatabe, K. Schoonjans, J. Lydon, B. W. O'Malley and J. Auwerx. 2002. «Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99(24), p. 15644-15648.
- Ramsay, J. E., W. R. Ferrell, L. Crawford, A. M. Wallace, I. A. Greer and N. Sattar. 2002. «Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 87(9), p. 4231-4237.
- Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein and D. J. Mangelsdorf. 2000. «Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta». *Genes Dev*, Vol. 14(22), p. 2819-2830.
- Ruan, X. Z., J. F. Moorhead, R. Fernando, D. C. Wheeler, S. H. Powis and Z. Varghese. 2004. «Regulation of lipoprotein trafficking in the kidney: role of inflammatory mediators and transcription factors». *Biochem Soc Trans*, Vol. 32(Pt 1), p. 88-91.
- Ruan, X. Z., J. F. Moorhead, J. L. Tao, K. L. Ma, D. C. Wheeler, S. H. Powis and Z. Varghese. 2006. «Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 26(5), p. 1150-1155.
- Salles, J., F. Sargueil, A. Knoll-Gellida, L. A. Witters, M. Shy, H. Jiang, C. Cassagne and B. Garbay. 2002. «Fatty acid synthase expression during peripheral nervous system myelination». *Brain Res Mol Brain Res*, Vol. 101(1-2), p. 52-58.
- Sever, N., B. L. Song, D. Yabe, J. L. Goldstein, M. S. Brown and R. A. DeBose-Boyd. 2003. «Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol». *J Biol Chem*, Vol. 278(52), p. 52479-52490.
- Shi, W., K. F. Swan, S. R. Lear, J. S. O'Neil, S. K. Erickson and M. C. Henson. 1999. «Regulation of pathways determining cholesterol availability in the baboon placenta with advancing gestation». *Biol Reprod*, Vol. 61(6), p. 1499-1505.
- Silliman, K. and N. Kretchmer. 1995. «Maternal obesity and body composition of the neonate». *Biol Neonate*, Vol. 68(6), p. 384-393.
- Simpson, E. R. and M. F. Burkhardt. 1980. «Acyl CoA:cholesterol acyl transferase activity in human placental microsomes: inhibition by progesterone». *Arch Biochem Biophys*, Vol. 200(1), p. 79-85.
- Spranger, J., A. Kroke, M. Mohlig, K. Hoffmann, M. M. Bergmann, M. Ristow, H.

- Boeing and A. F. Pfeiffer. 2003. «Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study». *Diabetes*, Vol. 52(3), p. 812-817.
- Sutter-Dub, M. T., A. Kaaya, A. Sfaxi, F. Sodoyez-Goffaux, J. C. Sodoyez and B. C. Sutter. 1988. «Progesterone and synthetic steroids produce insulin resistance at the post-receptor level in adipocytes of female rats». *Steroids*, Vol. 52(5-6), p. 583-608.
- Tuckey, R. C. 2005. «Progesterone synthesis by the human placenta». *Placenta*, Vol. 26(4), p. 273-281.
- Wakil, S. J., J. K. Stoops and V. C. Joshi. 1983. «Fatty acid synthesis and its regulation». *Annu Rev Biochem*, Vol. 52 p. 537-579.
- Wilentz, R. E., L. A. Witters and E. S. Pizer. 2000. «Lipogenic enzymes fatty acid synthase and acetyl-coenzyme A carboxylase are coexpressed with sterol regulatory element binding protein and Ki-67 in fetal tissues». *Pediatr Dev Pathol*, Vol. 3(6), p. 525-531.
- Woollett, L. A. 2005. «Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation». *Am J Clin Nutr*, Vol. 82(6), p. 1155-1161.
- Xu, J., M. T. Nakamura, H. P. Cho and S. D. Clarke. 1999. «Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats». *J Biol Chem*, Vol. 274(33), p. 23577-23583.
- Yabe, D., R. Komuro, G. Liang, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2003. «Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100(6), p. 3155-3160.
- Zeng, L., H. Liao, Y. Liu, T. S. Lee, M. Zhu, X. Wang, M. B. Stemerman, Y. Zhu and J. Y. Shyy. 2004. «Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism». *J Biol Chem*, Vol. 279(47), p. 48801-48807.

3.9 Figure legends

Fig. 3.1. Protein expression of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 in term placentas. The Western blot analyses of HMGR (A), FAS (B), nSREBP-2 (C) and nSREBP-1 (D) were performed on total proteins extracted from placenta of women classified according their plasmatic cholesterol level. Two different groups were formed: one for the Lower Median Cholesterol (LC [(□); n=30]) and another for the Higher Median Cholesterol (HC [(■); n=30]). Representative Western blot are shown below each panel (n=3 for each group). Results are expressed as the mean \pm SEM, where $^* = P < 0.05$.

Fig. 3.2. (A) Correlation between HMGR and nSREBP-2 protein expression in term placentas (LC group [(●); n=30], HC group [(□); n=30]). (B) Quantification of the SREBP-2 mRNA expression in term placentas by real-time PCR for both studied groups: Lower Median Cholesterol (LC group [(□); n=7]) and the Higher Median Cholesterol (HC group [(■), n=12]). Results are expressed as the mean \pm SEM, where $^* = P < 0.05$. (C) Identification of SREBP-1a and SREBP-1c mRNA expression by PCR in term placentas (n=4).

Fig. 3.3. Correlations of inflammatory cytokines with the different cholesterol fractions in term placentas. Correlations of FC with IL-1 β (A) or TNF- α (B), of TC with IL-1 β (C) or TNF- α (D), and of CE with IL-1 β (E) or TNF- α (F) were performed for both Lower Median Cholesterol (LC [(●); n=30]) and Higher Median Cholesterol (HC [(□); n=29]) women groups. $^* = P < 0.05$, $^{***} = P < 0.001$.

Fig. 3.4 Protein expression of HMGR, FAS, nSREBP-2 and nSREBP-1 in term placentas. The Western blot analyses of HMGR (A), FAS (B), nSREBP-2 (C) and nSREBP-1 (D) were performed on total proteins extracted from placenta of women without Gestational Diabetes Mellitus (Non-GDM [(■); n=60]) and of women with Gestational Diabetes Mellitus (GDM [(■); n=7]). Representative Western blot are shown below each panel (n=3 for each group). Results are

expressed as the mean \pm SEM.

3.10 Tables

Table 3.1: General characteristics of the 67 women, newborns and placentas

	LC (n=30)	HC (n=30)	Non-GDM (n=60)	GDM (n=7)
Mother				
Age (years)	31.2 ± 4.9	31.3 ± 5.1	31.3 ± 5.0	31.3 ± 4.2
Gestational age (weeks)	38.9 ± 1.4	39.4 ± 1.6	39.2 ± 1.5	39.0 ± 1.2
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 4.2	21.0 ± 3.3*	22.0 ± 3.9	28.0 ± 4.1 [§]
WG (kg)	15.3 ± 5.3	17.5 ± 6.0	16.4 ± 5.7	19.0 ± 11.7
Newborn				
Weight (g)	3361 ± 440	3395 ± 460	3378 ± 447	3448 ± 400
Height (cm)	51.4 ± 2.2	51.8 ± 2.7	51.6 ± 2.4	51.0 ± 1.8
Placenta				
Weight (g)	589 ± 128	610 ± 169	599 ± 149	537 ± 143

BMI: body mass index before pregnancy, WG: weight gain during pregnancy. Results are expressed as means ± SD where * = $P < 0.05$ compared with the LC group, and where [§] = $P < 0.05$ compared to the Non-GDM group

Table 3.2: Maternal and fetal plasmatic lipid concentrations and placental cholesterol tissue content

	LC (n=30)		HC (n=30)		Non-GDM (n=60)		GDM (n=7)	
	Mother (term)	Newborn	Mother (term)	Newborn	Mother (term)	Newborn	Mother (term)	Newborn
TC (mM)	5.52 ± 0.13	1.73 ± 0.09	7.72 ± 0.17***	1.69 ± 0.09	6.62 ± 0.18	1.71 ± 0.06	6.87 ± 0.60	1.80 ± 0.21
FFA (mM)	0.58 ± 0.07	0.18 ± 0.04	0.71 ± 0.06	0.15 ± 0.01	0.65 ± 0.05	0.16 ± 0.02	0.57 ± 0.11	0.21 ± 0.04
TG (mM)	2.69 ± 0.19	0.59 ± 0.07	3.27 ± 0.22	0.58 ± 0.05	2.98 ± 0.15	0.59 ± 0.04	3.42 ± 0.40	0.61 ± 0.10
	Placenta		Placenta		Placenta		Placenta	
FC (nmol/mg tissue)	8.08 ± 0.30		8.28 ± 0.36		8.18 ± 0.23		9.71 ± 0.99§	
TC (nmol/mg tissue)	9.81 ± 0.27		9.99 ± 0.33		9.90 ± 0.21		11.06 ± 0.82	
CE (nmol/mg tissue)	1.72 ± 0.20		1.71 ± 0.20		1.72 ± 0.14		1.31 ± 0.30	

Results are expressed as means ± SEM, where *** = $P < 0.001$ compared to the LC group, and where [§] = $P < 0.05$ compared to the Non-GDM group

Table 3.3: Inflammatory cytokines content in term placenta

	LC (n=30)	HC (n=29)	Non-GDM (n=59)	GDM (n=7)
IL-1β (pg/g tissue)	154.5 ± 17.2	165.4 ± 11.6	159.8 ± 10.4	286.2 ± 63.2 ^{§§§}
TNF-α (pg/g tissue)	60.2 ± 3.6	62.0 ± 3.1	61.1 ± 2.4	95.8 ± 14.4 ^{§§§}

Results are expressed as means ± SEM, where ^{§§§} = $P < 0.001$ compared to the Non-GDM group

3.11 Figures

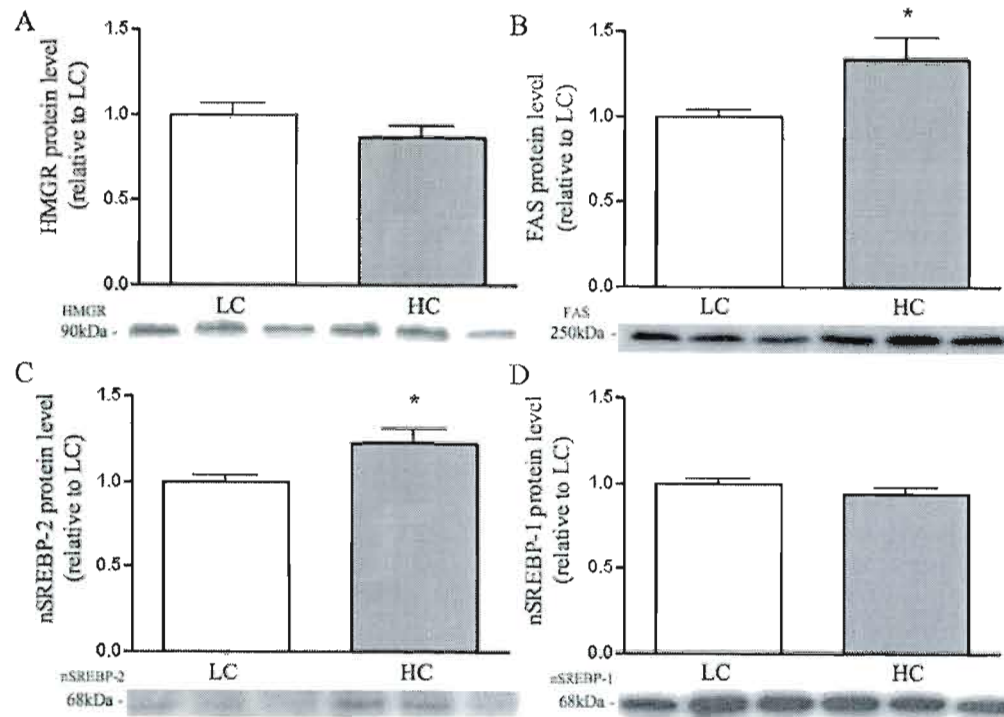


Fig 3.1

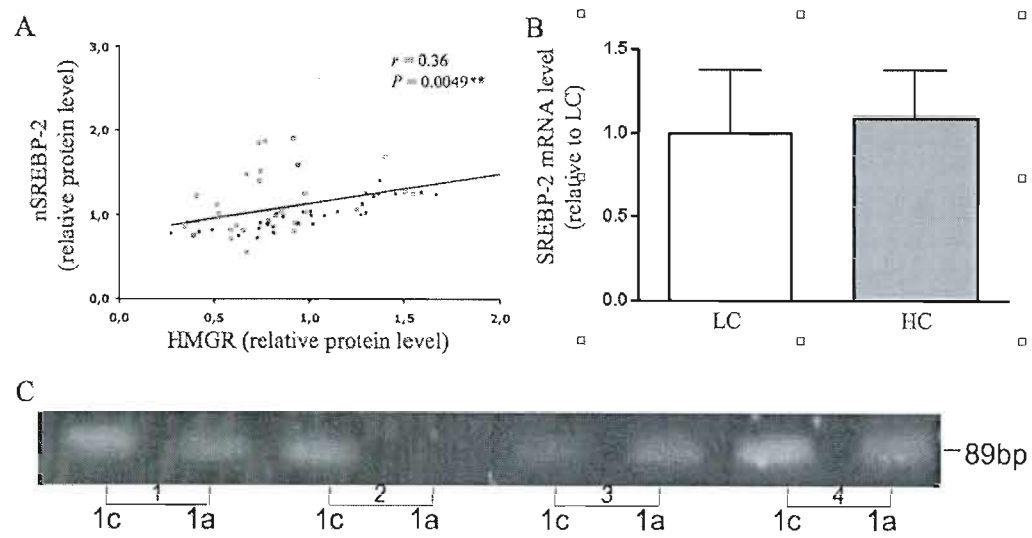


Fig 3.2

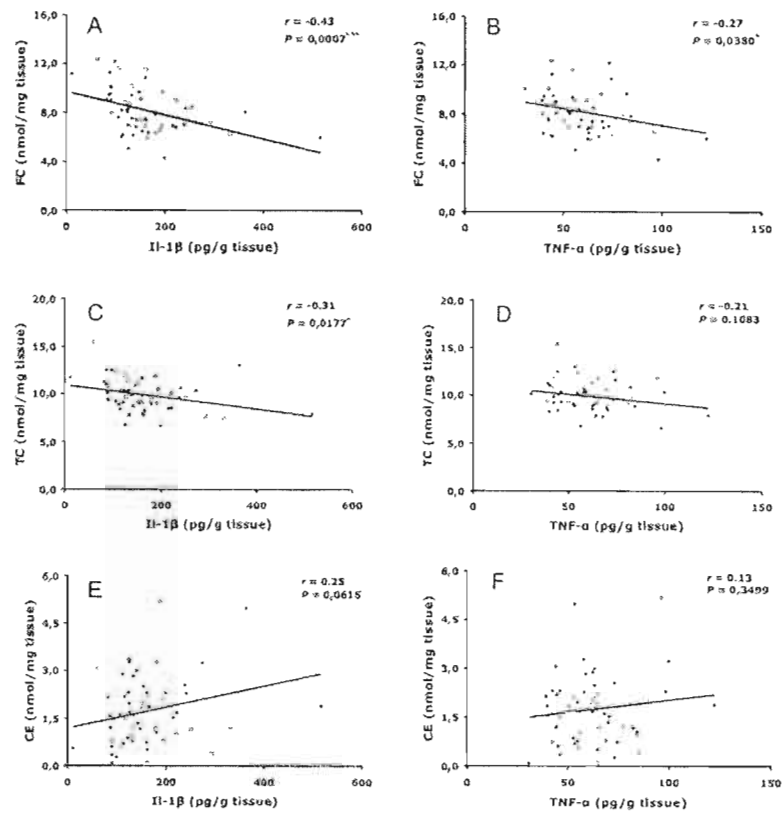
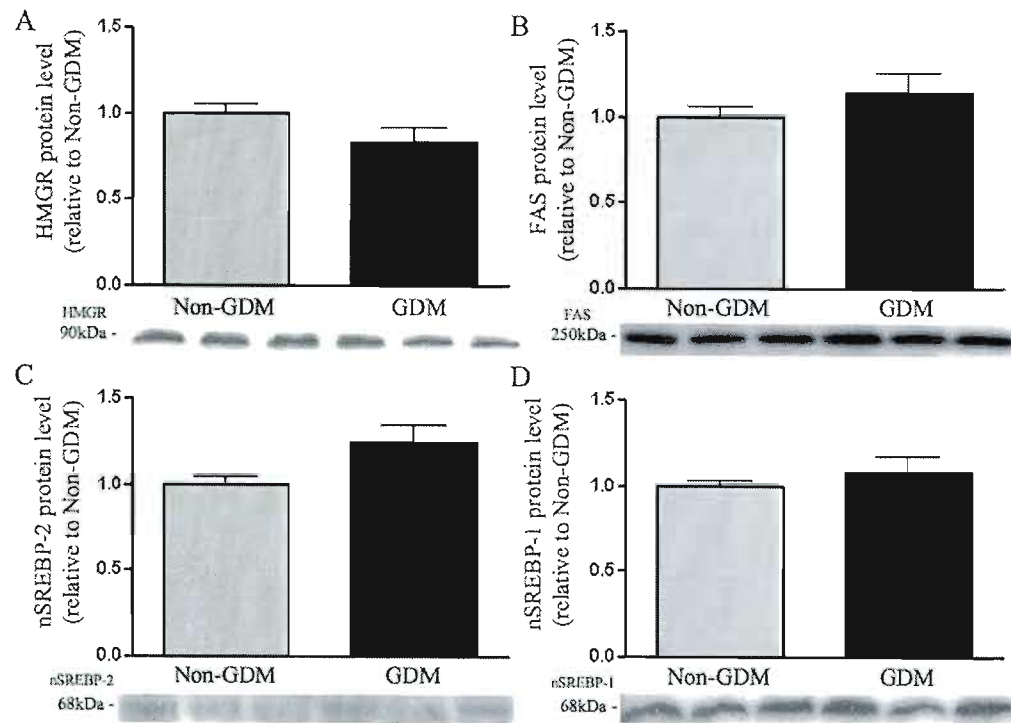


Fig 3.3

**Fig 3.4**

CHAPITRE IV

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE

4.1 Résultats complémentaires à l'article

Tableau 4.1 Niveau protéique relatif de la HMGR, de la nSREBP-2, de la FAS et de la nSREBP-1 dans le placenta humain selon les classifications par l'IMC ou le GDP

IMC	Maigreur (n = 12)	Santé (n = 33)	Surpoids (n = 13)	Obésité (n = 2)
HMGR	0.99 ± 0.16	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.06	0.67 ± 0.06
nSREBP-2	1.07 ± 0.09	1.00 ± 0.06	0.96 ± 0.12	0.76 ± 0.01
FAS	1.19 ± 0.19	1.00 ± 0.08	0.87 ± 0.19	0.57 ± 0.21
nSREBP-1	0.97 ± 0.07	1.00 ± 0.04	0.97 ± 0.04	1.00 ± 0.04
GDP	Inférieur (n = 11)	Normal (n = 11)	Supérieur (n = 38)	
HMGR	0.94 ± 0.16	1.00 ± 0.08	0.82 ± 0.05	
nSREBP-2	1.12 ± 0.09	1.00 ± 0.07	1.04 ± 0.06	
FAS	1.28 ± 0.21	1.00 ± 0.07	1.20 ± 0.09	
nSREBP-1	1.09 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.03 ± 0.03	

Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne.

Le tableau 4.1 montre que ni l'IMC, ni le GDP n'ont un effet sur l'expression des protéines HMGR, nSREBP-2, FAS et nSREBP-1. Il semble pourtant y avoir une tendance à la diminution de la nSREBP-2 et de la FAS avec la progression de l'IMC. Un échantillonnage plus important de la classe IMC "Obésité" pourrait permettre de vérifier si les tendances d'une expression à la baisse de la HMGR, la nSREBP-2 et de la FAS sont significatives. L'absence totale de significativité dans le tableau 4.1 pourrait indiquer que le poids maternel n'a pas une influence importante sur le métabolisme du cholestérol ou sur la lipogenèse au niveau du placenta humain.

CHAPITRE V

DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE À L'ARTICLE ET CONCLUSION

5.1 Discussion complémentaire

5.1.1 Importance des métabolismes étudiés dans le placenta

Ce qui ressort de notre étude est que la synthèse *de novo* du cholestérol dans le placenta humain semble avoir un rôle plus important que la synthèse *de novo* de lipides. Effectivement, puisque le placenta doit synthétiser en grande quantité des hormones stéroïdiennes telles l'œstrogène et la progestérone, il est préférable du point de vue fonctionnel de compléter l'apport maternel que d'en dépendre, car ceci pourrait influencer le maintien de la grossesse. Par ailleurs, l'emplacement du cholestérol au sein du RE est probablement important pour la synthèse des hormones stéroïdiennes, cet emplacement influençant déjà la maturation de SREBP-2 (Iddon, Wilkinson *et al.* 2001). De cette façon, la plupart des enzymes qui permettent la synthèse d'oestradiol et de progestérone à partir du cholestérol, ainsi que la HMGR, sont des enzymes du RE (Nussey 2001). La synthèse d'hormones stéroïdiennes dans le placenta pourrait bien alors préférer le cholestérol produit *in situ* à celui provenant de la circulation maternelle. Au niveau des acides gras, le fœtus est dépendant de la nutrition maternelle pour se procurer les acides gras polyinsaturés à longue chaîne essentiels (LC-PUFA), puisque plusieurs de ces acides gras ne sont pas synthétisés chez l'humain. La dépendance et la consommation du fœtus envers ces LC-PUFA essentiels est d'ailleurs accrue au troisième tiers de la grossesse (Herrera, Amusquivar *et al.* 2006). Puisque des acides gras doivent traverser les cellules placentaires de toute façon, ils minimisent probablement, ce faisant,

l'importance la synthèse *in situ* d'acide gras par le placenta.

5.1.2 Avenues sur les rôles placentaires potentiels de SREBP-2 dans le placenta

Le fait que la régulation de SREBP-2 dans le placenta humain n'est pas en accord avec les études réalisées antérieurement dans d'autres tissus est surprenant. Une augmentation de la transcription de gènes de la synthèse du cholestérol par SREBP-2 en réponse à une plus grande quantité de cholestérol côté maternel, n'apparaît pas logique. Outre les hypothèses émises dans l'article scientifique, il n'apparaît pas impossible qu'un mécanisme similaire à un déséquilibre du ratio SCAP/Insig lors de l'inflammation survienne dans ces conditions. Il est possible que, par l'entremise d'une molécule probablement dérivée du cholestérol maternel, il y ait augmentation de l'expression de la SCAP ou une diminution de l'expression des Insig dans le placenta. Ainsi, une présence plus élevée d'oxystérols régule à la baisse l'expression des Insig-1 (Janowski 2002). De cette façon, une plus grande quantité de cholestérol en circulation pourrait augmenter sa susceptibilité à être oxydé dans le sang. Une fois libérés dans le placenta, les oxystérols pourraient inhiber l'expression des Insig-1 et créer une augmentation du ratio SCAP/Insig.

5.1.3 Explications possibles pour le rôle mineur des SREBP-1

La faible activité transcriptionnelle des SREBP-1 dans le placenta pourrait être reliée à l'expression quasi équivalente existant entre la SREBP-1c et la SREBP-1a. En effet, les hétérodimères de SREBP-1, qui dans ces conditions seraient majoritaires, auraient dans le noyau une faible activité transcriptionnelle (Datta et Osborne 2005). De plus, l'isoforme de la SREBP-1c pourrait être retenue dans le RE par une plus grande quantité d'Insig-2, un isoforme d'Insig dont l'expression est diminuée par l'insuline (Yabe, Komuro *et al.* 2003). Puisque l'insuline ne franchit pas le placenta, les quantités d'INSIG-2 pourraient être élevées dans le placenta. L'Insig-2, exprimée de façon constitutive dans les tissus et semblant plus spécifique à la SREBP-1c, pourrait ainsi expliquer en partie la

faible activité lipogénique dans le placenta humain (Yabe, Komuro *et al.* 2003). Ainsi, la faible activité lipogénique du placenta serait principalement expliquée par l'absence d'insuline qui régule l'expression et l'activité transcriptionnelle de SREBP-1c.

5.1.4 Modulation du cholestérol plasmatique maternel en fonction de l'IMC et du GDP

Tel qu'indiqué dans la section résultats de l'article, il est assez surprenant qu'un cholestérol circulant élevé soit associé à un faible IMC. D'autres études ont d'ailleurs montré que l'IMC pré-grossesse n'avait aucun impact sur le cholestérol maternel circulant (Ramsay, Ferrell *et al.* 2002; Silliman et Kretchmer 1995). Bien que nous ayons démontré ici que le cholestérol plasmatique élevé augmente l'expression de la FAS et la nSREBP-2 dans le placenta, une baisse significative de ces protéines n'est pas observée quand les femmes sont classées par IMC croissant. L'absence de signification peut être associée au fait que 4 classes sont comparées au niveau de l'IMC, tandis que pour le cholestérol, seules deux classes sont opposées. En effet, il semble que pour le type d'analyses réalisées dans cette étude, la taille de l'échantillon est un critère clé pour déterminer la significativité.

Il semble aussi que les femmes ayant un niveau de cholestérol au dessus de la médiane, montrent un GDP tendant à être augmenté pendant la grossesse ($15.3 \pm 5.3\text{kg}$ pour le groupe LC, contre $17.5 \pm 6.0\text{kg}$ dans le groupe HC), paradoxalement à un IMC inférieur. Ainsi le cholestérol plus élevé pourrait être relié à une alimentation maternelle plus importante et peut-être plus riche en cholestérol, en compensation à une masse adipeuse inférieure pré-grossesse.

5.1.5 Relation entre le cholestérol maternel et l'inflammation

Il apparaissait logique qu'un niveau plus élevé de cholestérol chez les femmes enceintes serait corrélé avec une hausse des facteurs d'inflammation, ce qui ne semble pas être le cas. En accord avec nos observations, il apparaît que

bien que l'inflammation soit un indicateur des risques de maladies cardiovasculaires, au même titre que le cholestérol circulant, l'inflammation en tant que telle n'est pas corrélée au cholestérol circulant (Ridker, Rifai *et al.* 2002).

5.1.6 Le poids des placentas et le diabète gestationnel

Lors de diabète gestationnel (GDM), les placentas montrent une tendance de poids inférieur à ceux du groupe contrôle (respectivement $537 \pm 143\text{g}$ et $599 \pm 149\text{g}$). Si cette tendance n'est pas significative, elle cadre moins bien avec le diabète gestationnel où l'on observe normalement des placentas plus lourds, épais et larges que ceux de femmes contrôles (Ashfaq, Janjua *et al.* 2005). Ici, la prise d'insuline par les femmes du groupe GDM, pour rétablir les niveaux de glucose plasmatique, pourrait expliquer la différence de poids des placentas. Le poids des bébés étant pratiquement identiques dans les deux groupes, il est possible que la prise d'insuline, survenant quand le diabète est diagnostiqué, soit entre la 24^{ème} et la 28^{ème} semaine (début du 3^{ème} tiers), diminue le glucose disponible pour le placenta. Il faudrait cependant savoir si la prise d'insuline par la mère peut affecter la croissance du placenta, sans pour autant nuire de façon visible au fœtus à terme. L'autre possibilité pour expliquer le faible poids du placenta lors du GDM est le stress inflammatoire. Cependant, la présence d'inflammation est plutôt associée avec un âge gestationnel réduit et non à une réduction de poids du placenta (Mwanyumba, Inion *et al.* 2003). Notre groupe GDM ne démontre pas de différence au niveau de l'âge gestationnel qui pourrait expliquer une baisse du poids des placentas. Ce point reste donc à étudier.

5.1.7 Le GDM et les niveaux circulants de TG

Il est observé que les femmes avec le GDM ont un niveau supérieur de triglycérides circulant que les femmes contrôles, ce qui a déjà été rapporté (Kale, Kulkarni *et al.* 2005). Normalement, les femmes souffrant de GDM sont plus corpulantes (Kale, Kulkarni *et al.* 2005), ce qui est aussi observé dans notre étude qui démontre un IMC significativement supérieur ainsi qu'un GDP supérieur

chez les GDM. Chez la mère, les niveaux supérieurs de TG circulant pourraient découler de l'augmentation de la masse adipeuse des mères souffrant de GDM.

5.1.8 Rôle de l'IL-1 β et du TNF- α lors du GDM

Lors de diabète gestationnel, on observe un niveau trois fois plus élevé d'IL-1 β que du TNF- α . Une étude montre qu'une augmentation d'IL-1 β constitue un risque de développer un diabète de type 2 dans la population, alors que le TNF- α n'en est pas un (Spranger, Kroke *et al.* 2003). Ainsi, il n'est pas surprenant de voir une augmentation de IL-1 β lors de diabète gestationnel, une forme de diabète qui est souvent associée à un risque élevé de développer un diabète de type 2 après la grossesse (Forsbach-Sanchez, Tamez-Perez *et al.* 2005). Aussi, notre étude démontre que c'est l'IL-1 β qui influence les formes de cholestérol (libre ou estérifié) retrouvées dans le placenta. De ce fait, l'IL-1 β est la cytokine inflammatoire à cibler pour vérifier la présence de diabète gestationnel en plus de la concentration des différentes formes de cholestérol dans le placenta.

5.1.9 Inflammation et maturation de SREBP-1 lors du GDM

Dans la littérature montrant le court-circuitage de la maturation des SREBP par les cytokines inflammatoires, c'est-à-dire que la régulation de la maturation des SREBP par le cholestérol ne s'effectue pas en présence élevée de ces cytokines, il n'y a pas que la SREBP-2 qui soit affectée. La SREBP-1 l'est aussi (Ruan, Moorhead *et al.* 2004; Ruan, Moorhead *et al.* 2006). Il est légitime de se demander pourquoi le niveau de clivage de SREBP-1 n'est pas affecté par les cytokines. Comme avancé précédemment, sa faible expression en plus d'une grande expression d'Insig-2 en absence d'insuline dans le placenta doit suffire pour contre-balancer l'augmentation de l'expression de la SCAP par les cytokines.

5.1.10 L'augmentation du ratio FC/CE lors du GDM

Un effet spécifique au diabète gestationnel révélé par notre étude est l'augmentation du FC par rapport aux CE en présence d'inflammation dans le

placenta. Un débalancement du ratio acyltransferase acyl-CoA:cholesterol (ACAT):hydrolase d'ester de cholestérol (CEH) pourrait en être responsable. L'ACAT estérifie le FC en CE, alors que la CEH hydrolyse les CE en FC. Dans le placenta de babouin, la CEH est peu exprimée et est stable pendant la gestation, alors que l'activité de l'ACAT diminue tout au long de la gestation (Shi, Swan *et al.* 1999). Toutefois, une autre étude montre que l'activité de l'ACAT dans le placenta humain est inhibée par une hausse de progestérone et dans une moindre mesure l'oestradiol (Simpson et Burkhart 1980). Les résultats sur le cholestérol lors du GDM pourraient donc être expliqués par une synthèse plus élevée de progestérone, une hormone qui pourrait être d'ailleurs reliée à la création du GDM (Branisteanu et Mathieu 2003). Ceci expliquerait la baisse des CE en faveur du FC, résultant de la baisse de l'activité de l'ACAT par la production élevée d'hormones stéroïdiennes placentaires dans le groupe de femmes avec GDM.

5.2 Conclusion

Au terme de ce projet entrepris il y a plus de 2 ans maintenant, il faut noter que les objectifs et les manipulations du projet ont été en constante évolution par rapport au projet initial. Le temps et le matériel étant en effet toujours des facteurs limitant. Pour ce qui est des objectifs mêmes du projets, les manipulations entreprises et les résultats obtenus apportent bien sûr plusieurs parties de réponse, mais aussi de nouveaux questionnements qui devront être résolus par d'autres études. Tous les objectifs abordés par l'étude menée en laboratoire étaient reliés à la synthèse *in situ* de cholestérol et d'acides gras dans le placenta à terme.

La première prémisse du projet voulait évaluer l'impact du cholestérol circulant maternel. Il se trouve que paradoxalement, en présence de cholestérol maternel circulant plus élevé, l'expression en ARNm des protéines dans la voie du cholestérol semble être augmentée, sans doute corrélée à une plus grande présence de SREBP-2 dans le noyau. La raison de cette augmentation qui est contraire à celle des hypothèses de départ, reste à étudier. Bien que certaines

enzymes telle que la HMGR peuvent contre-balancer cette hausse de SREBP-2 par la modulation de l'activité de dégradation de la protéine, l'augmentation de l'expression de plusieurs autres enzymes de la voie du cholestérol, dont la régulation est essentiellement transcriptionnelle, pourrait mener à un débalancement de certains produits de la voie du cholestérol. À tout le moins, l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol semble diminuer dans le placenta en présence d'un haut niveau de cholestérol maternel. Ceci résulte en une synthèse placentaire réduite, même si le transport placentaire et/ou le métabolisme foetal régulent probablement le cholestérol de la circulation fœtale plus efficacement. L'autre effet de l'augmentation de SREBP-2 mature est une production plus élevée de palmitate par la FAS. Une augmentation du cholestérol circulant pourrait alors bien entraîner un débalancement dans la quantité d'acides gras se rendant au fœtus. Heureusement, cet impact ne se fait pas sentir au niveau du sang de cordon fœtal, probablement encore une fois dû à une modulation du transport placentaire ou du métabolisme fœtal. De son côté, la SREBP-1 semble de faible importance dans le placenta. Son activité en tant que telle est peut-être par ailleurs diminuée par la présence de niveaux semblables des isoformes SREBP-1a et SREBP-1c ainsi que par l'absence d'insuline dans le placenta.

Au niveau de l'impact de l'IMC pré-grossesse et du gain de poids pendant la grossesse, les hypothèses avancées se sont avérées erronées. Autant pour les enzymes ciblées que pour la régulation des deux métabolismes dans le placenta, aucun effet significatif n'est observé à terme. Ainsi, les facteurs que sont l'IMC et le GDP ne doivent pas être identifiés comme les seuls facteurs de risque sur le développement fœtal. De meilleurs facteurs pour évaluer le risque doivent être employés, comme par exemple, le tour de taille qui a récemment détrôné l'IMC en tant que prédicteur des maladies coronariennes et du diabète de type 2 chez l'homme, mais pas chez la femme.

L'effet du diabète gestationnel est tout aussi intéressant que celui du cholestérol maternel circulant. Effectivement, son impact sur les protéines ciblées

s'apparente à celui d'une hausse de cholestérol maternel, et ce, sans que ne varie le cholestérol plasmatique des femmes. Telle que la théorie et les hypothèses suggéraient, une hausse des cytokines inflammatoires a été remarquée, entraînant une augmentation du clivage des SREBP-2. Ceci a eu un effet semblable à une hausse du cholestérol maternel circulant sur la HMGR et la FAS. L'augmentation de la synthèse du FC lors du GDM, pourrait d'ailleurs bien participer à la synthèse de progestérone, une hormone identifiée comme un des facteurs responsables du développement du diabète gestationnel. Tout comme pour ce qui a été observé dans le cas du cholestérol maternel circulant, le niveau d'expression de SREBP-1 n'a pas montré de différence avec le GDM.

Cette recherche a donc permis d'identifier l'impact du cholestérol maternel circulant, des différentes classifications reliées au poids de la mère et du diabète gestationnel sur les métabolismes de la synthèse du cholestérol et des acides gras dans le placenta. Cette étude permet par ailleurs d'avancer que la meilleure compensation à terme pour les variations maternelles ne proviendrait pas du métabolisme placentaire en tant que tel, mais de son transport et/ou du métabolisme fœtal. Reste à savoir le fonctionnement de ces mécanismes de compensation et comment ils pourraient expliquer les facteurs de risque liés à l'environnement maternel.

APPENDICE A

CONTRIBUTION DE L'ÉTUDIANT AU PROJET

Ce qu'il a fait:

- ✕ Extractions de protéines du placenta
- ✕ Immunobuvardages (et mise au point)
- ✕ Extractions d'ARNm du placenta
- ✕ PCR en temps réel et semi-quantitatif (et mise au point)
- ✕ Extraction de la fraction lipide du placenta
- ✕ Évaluation du cholestérol
- ✕ Évaluation des cytokines
- ✕ Analyse des résultats
- ✕ L'article scientifique
- ✕ Le mémoire

Ce qu'il n'a pas fait:

- ⊙ Recrutement des femmes du projet
- ⊙ Compilation des données des questionnaires
- ⊙ Recueillement et disposition des placentas et dosages sanguins
- ⊙ Dosages du cholestérol, des triglycérides et des acides gras libres circulants
- ⊙ Compilation des données des dosages plasmatiques

APPENDICE B

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, C. M., J. Reitz, J. K. De Brabander, J. D. Feramisco, L. Li, M. S. Brown and J. L. Goldstein. 2004. «Cholesterol and 25-hydroxycholesterol inhibit activation of SREBPs by different mechanisms, both involving SCAP and insigs». *J Biol Chem*, Vol. p.
- Amemiya-Kudo, M., H. Shimano, A. H. Hastay, N. Yahagi, T. Yoshikawa, T. Matsuzaka, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, J. Osuga, K. Harada, T. Gotoda, R. Sato, S. Kimura, S. Ishibashi and N. Yamada. 2002. «Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes». *J Lipid Res*, Vol. 43(8), p. 1220-1235.
- Archer, D. F., R. S. Mathur, N. Wiquist and E. Diczfalussy. 1971. «Quantitative assessment of the de novo sterol and steroid synthesis in the human foeto-placental unit. 2. Synthesis and secretion of steroids and steroid sulphates by the midgestation foetus». *Acta Endocrinol (Copenh)*, Vol. 66(4), p. 666-678.
- Ashfaq, M., M. Z. Janjua and M. A. Channa. 2005. «Effect of gestational diabetes and maternal hypertension on gross morphology of placenta». *J Ayub Med Coll Abbottabad*, Vol. 17(1), p. 44-47.
- Bansal, N., J. K. Cruickshank, P. McElduff and P. N. Durrington. 2005. «Cord blood lipoproteins and prenatal influences». *Curr Opin Lipidol*, Vol. 16(4), p. 400-408.
- Barker, D. J., J. G. Eriksson, T. Forsen and C. Osmond. 2002. «Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis». *Int J Epidemiol*, Vol. 31(6), p. 1235-1239.
- Bennett, M. K., J. I. Toth and T. F. Osborne. 2004. «Selective association of sterol regulatory element-binding protein isoforms with target promoters in vivo». *J Biol Chem*, Vol. 279(36), p. 37360-37367.
- Bjorkhem, I. and U. Diczfalussy. 2002. «Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers?». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 22(5), p. 734-742.
- Branisteanu, D. D. and C. Mathieu. 2003. «Progesterone in gestational diabetes mellitus: guilty or not guilty?». *Trends Endocrinol Metab*, Vol. 14(2), p. 54-56.
- Brown, A. J., L. Sun, J. D. Feramisco, M. S. Brown and J. L. Goldstein. 2002. «Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism». *Mol Cell*, Vol. 10(2), p. 237-245.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1997. «The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription

- factor». *Cell*, Vol. 89(3), p. 331-340.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein. 1999. «A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96(20), p. 11041-11048.
- Cagen, L. M., X. Deng, H. G. Wilcox, E. A. Park, R. Raghow and M. B. Elam. 2004. «Insulin activates the rat sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) promoter through the combinatorial actions of SREBP, LXR, Sp-1, and NF-Y cis-acting elements». *Biochem J*, Vol. Pt p.
- Calvo, R., M. J. Obregon, F. Escobar del Rey and G. Morreale de Escobar. 1992. «The rat placenta and the transfer of thyroid hormones from the mother to the fetus. Effects of maternal thyroid status». *Endocrinology*, Vol. 131(1), p. 357-365.
- Cao, G., C. K. Garcia, K. L. Wyne, R. A. Schultz, K. L. Parker and H. H. Hobbs. 1997. «Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1». *J Biol Chem*, Vol. 272(52), p. 33068-33076.
- Catalano, P. M. and J. P. Kirwan. 2001. «Maternal factors that determine neonatal size and body fat». *Curr Diab Rep*, Vol. 1(1), p. 71-77.
- Challier, J. C., S. Hauguel and V. Desmaizieres. 1986. «Effect of insulin on glucose uptake and metabolism in the human placenta». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 62(5), p. 803-807.
- Ching, Y. P., T. Kobayashi, S. Tamura and D. G. Hardie. 1997. «Specificity of different isoforms of protein phosphatase-2A and protein phosphatase-2C studied using site-directed mutagenesis of HMG-CoA reductase». *FEBS Lett*, Vol. 411(2-3), p. 265-268.
- Ciaraldi, T. P., M. Kettel, A. el-Roeiy, Z. Madar, D. Reichart, S. S. Yen and J. M. Olefsky. 1994. «Mechanisms of cellular insulin resistance in human pregnancy». *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 170(2), p. 635-641.
- Datta, S. and T. F. Osborne. 2005. «Activation domains from both monomers contribute to transcriptional stimulation by sterol regulatory element-binding protein dimers». *J Biol Chem*, Vol. 280(5), p. 3338-3345.
- Dentin, R., J. P. Pegorier, F. Benhamed, F. Foufelle, P. Ferre, V. Fauveau, M. A. Magnuson, J. Girard and C. Postic. 2004. «Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression». *J Biol Chem*, Vol. 279(19), p. 20314-20326.
- Dimes, M. o. (2005). Maternal Obesity and Pregnancy: Weight Matters.
- Elliott, J. A. 1975. «The effect of pregnancy on the control of lipolysis in fat cells isolated from human adipose tissue». *Eur J Clin Invest*, Vol. 5(2), p. 159-163.
- Espenshade, P. J., W. P. Li and D. Yabe. 2002. «Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99(18), p. 11694-11699.
- Felder, T. K., K. Klein, W. Patsch and H. Oberkofler. 2005. «A novel SREBP-1 splice variant: tissue abundance and transactivation potency». *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1731(1), p. 41-47.
- Foretz, M., C. Pacot, I. Dugail, P. Lemarchand, C. Guichard, X. Le Liepvre, C. Berthelie-Lubrano, B. Spiegelman, J. B. Kim, P. Ferre and F. Foufelle. 1999. «ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic

- gene expression by glucose». *Mol Cell Biol*, Vol. 19(5), p. 3760-3768.
- Forsbach-Sanchez, G., H. E. Tamez-Perez and J. Vazquez-Lara. 2005. «Diabetes and pregnancy». *Arch Med Res*, Vol. 36(3), p. 291-299.
- Furuhashi, M., H. Seo, S. Mizutani, O. Narita, Y. Tomoda and N. Matsui. 1989. «Expression of low density lipoprotein receptor gene in human placenta during pregnancy». *Mol Endocrinol*, Vol. 3(8), p. 1252-1256.
- Gauthier, B., M. Robb, F. Gaudet, G. S. Ginsburg and R. McPherson. 1999. «Characterization of a cholesterol response element (CRE) in the promoter of the cholesteryl ester transfer protein gene: functional role of the transcription factors SREBP-1a, -2, and YY1». *J Lipid Res*, Vol. 40(7), p. 1284-1293.
- Giandomenico, V., M. Simonsson, E. Gronroos and J. Ericsson. 2003. «Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors». *Mol Cell Biol*, Vol. 23(7), p. 2587-2599.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown. 1990. «Regulation of the mevalonate pathway». *Nature*, Vol. 343(6257), p. 425-430.
- Hammad, S. M., S. Stefansson, W. O. Twal, C. J. Drake, P. Fleming, A. Remaley, H. B. Brewer, Jr. and W. S. Argraves. 1999. «Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B(12) complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96(18), p. 10158-10163.
- Hannah, V. C., J. Ou, A. Luong, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2001. «Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells». *J Biol Chem*, Vol. 276(6), p. 4365-4372.
- Hatzopoulos, A. K., A. Rigotti, R. D. Rosenberg and M. Krieger. 1998. «Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis». *J Lipid Res*, Vol. 39(3), p. 495-508.
- Hay, W. W., Jr. 1994. «Placental transport of nutrients to the fetus». *Horm Res*, Vol. 42(4-5), p. 215-222.
- Heitritter, S. M., C. G. Solomon, G. F. Mitchell, N. Skali-Ounis and E. W. Seely. 2005. «Subclinical inflammation and vascular dysfunction in women with previous gestational diabetes mellitus». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 90(7), p. 3983-3988.
- Hellig, H., D. Gattereau, Y. Lefebvre and E. Bolte. 1970. «Steroid production from plasma cholesterol. I. Conversion of plasma cholesterol to placental progesterone in humans». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 30(5), p. 624-631.
- Herrera, E., E. Amusquivar, I. Lopez-Soldado and H. Ortega. 2006. «Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer». *Horm Res*, Vol. 65 Suppl 3 p. 59-64.
- Hirano, Y., M. Yoshida, M. Shimizu and R. Sato. 2001. «Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway». *J Biol Chem*, Vol. 276(39), p. 36431-36437.
- Horton, J. D., J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2002. «SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver». *J Clin Invest*, Vol. 109(9), p. 1125-1131.
- Horton, J. D., Y. Bashmakov, I. Shimomura and H. Shimano. 1998. «Regulation

- of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 95(11), p. 5987-5992.
- Hua, X., A. Nohturfft, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 1996. «Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein». *Cell*, Vol. 87(3), p. 415-426.
- Hua, X., J. Wu, J. L. Goldstein, M. S. Brown and H. H. Hobbs. 1995. «Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13». *Genomics*, Vol. 25(3), p. 667-673.
- Hua, X., C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein and X. Wang. 1993. «SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 90(24), p. 11603-11607.
- Iddon, C. R., J. Wilkinson, A. J. Bennett, J. Bennett, A. M. Salter and J. A. Higgins. 2001. «A role for smooth endoplasmic reticulum membrane cholesterol ester in determining the intracellular location and regulation of sterol-regulatory-element-binding protein-2». *Biochem J*, Vol. 358(Pt 2), p. 415-422.
- Inoue, J., R. Sato and M. Maeda. 1998. «Multiple DNA elements for sterol regulatory element-binding protein and NF-Y are responsible for sterol-regulated transcription of the genes for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase». *J Biochem (Tokyo)*, Vol. 123(6), p. 1191-1198.
- Ishii, S., K. Iizuka, B. C. Miller and K. Uyeda. 2004. «Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 101(44), p. 15597-15602.
- Istvan, E. S. and J. Deisenhofer. 2000. «The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase». *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1529(1-3), p. 9-18.
- Janowski, B. A. 2002. «The hypocholesterolemic agent LY295427 up-regulates INSIG-1, identifying the INSIG-1 protein as a mediator of cholesterol homeostasis through SREBP». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99(20), p. 12675-12680.
- Jingami, H., M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. G. Anderson and K. L. Luskey. 1987. «Partial deletion of membrane-bound domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase eliminates sterol-enhanced degradation and prevents formation of crystalloid endoplasmic reticulum». *J Cell Biol*, Vol. 104(6), p. 1693-1704.
- Joseph, S. B., B. A. Laffitte, P. H. Patel, M. A. Watson, K. E. Matsukuma, R. Walczak, J. L. Collins, T. F. Osborne and P. Tontonoz. 2002. «Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors». *J Biol Chem*, Vol. 277(13), p. 11019-11025.
- Jump, D. B., D. Botolin, Y. Wang, J. Xu, B. Christian and O. Demeure. 2005. «Fatty acid regulation of hepatic gene transcription». *J Nutr*, Vol. 135(11), p. 2503-2506.
- Kale, S. D., S. R. Kulkarni, H. G. Lubree, K. Meenakumari, V. U. Deshpande, S. S. Rege, J. Deshpande, K. J. Coyaji and C. S. Yajnik. 2005. «Characteristics of gestational diabetic mothers and their babies in an

- Indian diabetes clinic». *J Assoc Physicians India*, Vol. 53 p. 857-863.
- Kim, C., K. M. Newton and R. H. Knopp. 2002. «Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review». *Diabetes Care*, Vol. 25(10), p. 1862-1868.
- King, J. C., N. F. Butte, M. N. Bronstein, L. E. Kopp and S. A. Lindquist. 1994. «Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status». *Am J Clin Nutr*, Vol. 59(2 Suppl), p. 439S-445S.
- Lafond, J., M. C. Charest, J. F. Alain, L. Brissette, A. Masse, J. Robidoux and L. Simoneau. 1999. «Presence of CLA-1 and HDL binding sites on syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta». *Placenta*, Vol. 20(7), p. 583-590.
- Lagiou, P., R. M. Tamimi, L. A. Mucci, H. O. Adami, C. C. Hsieh and D. Trichopoulos. 2004. «Diet during pregnancy in relation to maternal weight gain and birth size». *Eur J Clin Nutr*, Vol. 58(2), p. 231-237.
- Langmann, T., J. Klucken, M. Reil, G. Liebisch, M. F. Luciani, G. Chimini, W. E. Kaminski and G. Schmitz. 1999. «Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages». *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 257(1), p. 29-33.
- Le Jossic-Corcos, C., G. M. Pastori, S. Duclos, Y. Kawabe, T. Pineau and P. Bournot. 2004. «Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) activators induce hepatic farnesyl diphosphate synthase gene expression in rodents». *J Steroid Biochem Mol Biol*, Vol. 88(2), p. 203-211.
- Liang, G., J. Yang, J. D. Horton, R. E. Hammer, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2002. «Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c». *J Biol Chem*, Vol. 277(11), p. 9520-9528.
- Lloyd, D. B. and J. F. Thompson. 1995. «Transcriptional modulators affect in vivo protein binding to the low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoters». *J Biol Chem*, Vol. 270(43), p. 25812-25818.
- Loewen, C. J. and T. P. Levine. 2002. «Cholesterol homeostasis: not until the SCAP lady INSIGs». *Curr Biol*, Vol. 12(22), p. R779-781.
- Madsen, E. M., M. L. Lindegaard, C. B. Andersen, P. Damm and L. B. Nielsen. 2004. «Human placenta secretes apolipoprotein B-100-containing lipoproteins». *J Biol Chem*, Vol. 279(53), p. 55271-55276.
- Magana, M. M. and T. F. Osborne. 1996. «Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter». *J Biol Chem*, Vol. 271(51), p. 32689-32694.
- Magana, M. M., S. H. Koo, H. C. Towle and T. F. Osborne. 2000. «Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase». *J Biol Chem*, Vol. 275(7), p. 4726-4733.
- Marieb, E. N. 1999. *Anatomie et physiologie humaines*. Montréal: Éditions du nouveau pédagogique inc.
- Martin-Hidalgo, A., C. Holm, P. Belfrage, M. C. Schotz and E. Herrera. 1994.

- «Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy». *Am J Physiol*, Vol. 266(6 Pt 1), p. E930-935.
- Mater, M. K., A. P. Thelen, D. A. Pan and D. B. Jump. 1999. «Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription». *J Biol Chem*, Vol. 274(46), p. 32725-32732.
- Mathur, R. S., D. F. Archer, N. Wijkvist and E. Diczfalussy. 1970. «Quantitative assessment of the de novo sterol and steroid synthesis in the human foeto-placental unit. I. Synthesis and secretion of cholesterol and cholesterol sulphate». *Acta Endocrinol (Copenh)*, Vol. 65(4), p. 663-674.
- McPherson, R. and A. Gauthier. 2004. «Molecular regulation of SREBP function: the Insig-SCAP connection and isoform-specific modulation of lipid synthesis». *Biochem Cell Biol*, Vol. 82(1), p. 201-211.
- Mondestin, M. A., C. V. Ananth, J. C. Smulian and A. M. Vintzileos. 2002. «Birth weight and fetal death in the United States: the effect of maternal diabetes during pregnancy». *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 187(4), p. 922-926.
- Moon, Y. S., M. J. Latasa, M. J. Griffin and H. S. Sul. 2002. «Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids». *J Lipid Res*, Vol. 43(5), p. 691-698.
- Mwanyumba, F., I. Inion, P. Gaillard, K. Mandaliya, M. Praet and M. Temmerman. 2003. «Placental inflammation and perinatal outcome». *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, Vol. 108(2), p. 164-170.
- Ness, G. C., Z. Zhao and L. Wiggins. 1994. «Insulin and glucagon modulate hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by affecting immunoreactive protein levels». *J Biol Chem*, Vol. 269(46), p. 29168-29172.
- Nieuwenhuizen, A. G., G. A. Schuiling, L. G. Hilbrands, E. M. Bisschop and T. R. Koiter. 1998. «Proliferation of pancreatic islet-cells in cyclic and pregnant rats after treatment with progesterone». *Horm Metab Res*, Vol. 30(11), p. 649-655.
- Nussey, S. W., S. 2001. «*Endocrinology: An Integrated Approach*». Chap. in *The adrenal gland*. London: p.
- Omkumar, R. V., B. G. Darnay and V. W. Rodwell. 1994. «Modulation of Syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity by phosphorylation. Role of serine 871». *J Biol Chem*, Vol. 269(9), p. 6810-6814.
- Osborne, A. R., V. V. Pollock, W. R. Lagor and G. C. Ness. 2004. «Identification of insulin-responsive regions in the HMG-CoA reductase promoter». *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 318(4), p. 814-818.
- Osborne, T. F. 2000. «Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action». *J Biol Chem*, Vol. 275(42), p. 32379-32382.
- Ou, J., H. Tu, B. Shan, A. Luk, R. A. DeBose-Boyd, Y. Bashmakov, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2001. «Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR». *Proc Natl Acad Sci*

- U S A*, Vol. 98(11), p. 6027-6032.
- Palinski, W., F. P. D'Armiento, J. L. Witztum, F. de Nigris, F. Casanada, M. Condorelli, M. Silvestre and C. Napoli. 2001. «Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits». *Circ Res*, Vol. 89(11), p. 991-996.
- Papiernik, E., Cabrol, D., Pons, J-C. 1995. *Obstétrique*. Paris: Médecine-Sciences/Flammarion.
- Pawar, A., D. Botolin, D. J. Mangelsdorf and D. B. Jump. 2003. «The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression». *J Biol Chem*, Vol. 278(42), p. 40736-40743.
- Picard, F., M. Wanatabe, K. Schoonjans, J. Lydon, B. W. O'Malley and J. Auwerx. 2002. «Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99(24), p. 15644-15648.
- Qureshi, I. A., X. R. Xi, Y. R. Limbu, H. Y. Bin and M. I. Chen. 1999. «Hyperlipidaemia during normal pregnancy, parturition and lactation». *Ann Acad Med Singapore*, Vol. 28(2), p. 217-221.
- Ramsay, J. E., W. R. Ferrell, L. Crawford, A. M. Wallace, I. A. Greer and N. Sattar. 2002. «Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways». *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 87(9), p. 4231-4237.
- Repa, J. J., G. Liang, J. Ou, Y. Bashmakov, J. M. Lobaccaro, I. Shimomura, B. Shan, M. S. Brown, J. L. Goldstein and D. J. Mangelsdorf. 2000. «Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta». *Genes Dev*, Vol. 14(22), p. 2819-2830.
- Richardson, B., M. N. Palgunachari, G. M. Anantharamaiah, R. G. Richards, N. Azrolan, D. Wiginton and S. Handwerger. 1996. «Human placental tissue expresses a novel 22.7 kDa apolipoprotein A-I-like protein». *Biochemistry*, Vol. 35(23), p. 7580-7585.
- Ridker, P. M., N. Rifai, L. Rose, J. E. Buring and N. R. Cook. 2002. «Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events». *N Engl J Med*, Vol. 347(20), p. 1557-1565.
- Rindler, M. J., M. G. Traber, A. L. Esterman, N. A. Bersinger and J. Dancis. 1991. «Synthesis and secretion of apolipoprotein E by human placenta and choriocarcinoma cell lines». *Placenta*, Vol. 12(6), p. 615-624.
- Roncero, C. and A. G. Goodridge. 1992. «Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture». *J Biol Chem*, Vol. 267(21), p. 14918-14927.
- Rothblat, G. H., M. de la Llera-Moya, V. Atger, G. Kellner-Weibel, D. L. Williams and M. C. Phillips. 1999. «Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights». *J Lipid Res*, Vol. 40(5), p. 781-796.
- Ruan, X. Z., J. F. Moorhead, R. Fernando, D. C. Wheeler, S. H. Powis and Z. Varghese. 2004. «Regulation of lipoprotein trafficking in the kidney: role

- of inflammatory mediators and transcription factors». *Biochem Soc Trans*, Vol. 32(Pt 1), p. 88-91.
- Ruan, X. Z., J. F. Moorhead, J. L. Tao, K. L. Ma, D. C. Wheeler, S. H. Powis and Z. Varghese. 2006. «Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 26(5), p. 1150-1155.
- Sakai, J., E. A. Duncan, R. B. Rawson, X. Hua, M. S. Brown and J. L. Goldstein. 1996. «Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment». *Cell*, Vol. 85(7), p. 1037-1046.
- Salles, J., F. Sargueil, A. Knoll-Gellida, L. A. Witters, M. Shy, H. Jiang, C. Cassagne and B. Garbay. 2002. «Fatty acid synthase expression during peripheral nervous system myelination». *Brain Res Mol Brain Res*, Vol. 101(1-2), p. 52-58.
- Sato, R., J. Yang, X. Wang, M. J. Evans, Y. K. Ho, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 1994. «Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation domains of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1)». *J Biol Chem*, Vol. 269(25), p. 17267-17273.
- Schmid, K. E., W. S. Davidson, L. Myatt and L. A. Woollett. 2003. «Transport of cholesterol across a BeWo cell monolayer: implications for net transport of sterol from maternal to fetal circulation». *J Lipid Res*, Vol. 44(10), p. 1909-1918.
- Sever, N., T. Yang, M. S. Brown, J. L. Goldstein and R. A. DeBose-Boyd. 2003. «Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain». *Mol Cell*, Vol. 11(1), p. 25-33.
- Sever, N., B. L. Song, D. Yabe, J. L. Goldstein, M. S. Brown and R. A. DeBose-Boyd. 2003. «Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol». *J Biol Chem*, Vol. 278(52), p. 52479-52490.
- Shi, W., K. F. Swan, S. R. Lear, J. S. O'Neil, S. K. Erickson and M. C. Henson. 1999. «Regulation of pathways determining cholesterol availability in the baboon placenta with advancing gestation». *Biol Reprod*, Vol. 61(6), p. 1499-1505.
- Shimomura, I., H. Shimano, J. D. Horton, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 1997. «Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells». *J Clin Invest*, Vol. 99(5), p. 838-845.
- Silliman, K. and N. Kretchmer. 1995. «Maternal obesity and body composition of the neonate». *Biol Neonate*, Vol. 68(6), p. 384-393.
- Simonet, W. S. and G. C. Ness. 1988. «Transcriptional and posttranscriptional regulation of rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase by thyroid hormones». *J Biol Chem*, Vol. 263(25), p. 12448-12453.
- Simpson, E. R. and M. F. Burkhardt. 1980. «Acyl CoA:cholesterol acyl transferase activity in human placental microsomes: inhibition by progesterone». *Arch Biochem Biophys*, Vol. 200(1), p. 79-85.

- Smith, S., A. Witkowski and A. K. Joshi. 2003. «Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase». *Prog Lipid Res*, Vol. 42(4), p. 289-317.
- Spranger, J., A. Kroke, M. Mohlig, K. Hoffmann, M. M. Bergmann, M. Ristow, H. Boeing and A. F. Pfeiffer. 2003. «Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study». *Diabetes*, Vol. 52(3), p. 812-817.
- Stapleton, S. R., D. A. Mitchell, L. M. Salati and A. G. Goodridge. 1990. «Triiodothyronine stimulates transcription of the fatty acid synthase gene in chick embryo hepatocytes in culture. Insulin and insulin-like growth factor amplify that effect». *J Biol Chem*, Vol. 265(30), p. 18442-18446.
- Sutter-Dub, M. T., A. Kaaya, A. Sfaxi, F. Sodoyez-Goffaux, J. C. Sodoyez and B. C. Sutter. 1988. «Progesterone and synthetic steroids produce insulin resistance at the post-receptor level in adipocytes of female rats». *Steroids*, Vol. 52(5-6), p. 583-608.
- Tuckey, R. C. 2005. «Progesterone synthesis by the human placenta». *Placenta*, Vol. 26(4), p. 273-281.
- Van Aerde, J., M. Feldman and M. T. Clandinin. 1998. «Fetal and Neonatal Physiology». Chap. in *Accretion of lipid in the fetus and newborn*. Philadelphia: p. 458-477.
- Voet, D., Voet, J. D. 1998. *Biochimie*. Bruxelles: de boeck université.
- Wang, H., F. Liu, C. F. Millette and D. L. Kilpatrick. 2002. «Expression of a novel, sterol-insensitive form of sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) in male germ cells suggests important cell- and stage-specific functions for SREBP targets during spermatogenesis». *Mol Cell Biol*, Vol. 22(24), p. 8478-8490.
- Wang, H., J. T. San Agustin, G. B. Witman and D. L. Kilpatrick. 2004. «Novel role for a sterol response element binding protein in directing spermatogenic cell-specific gene expression». *Mol Cell Biol*, Vol. 24(24), p. 10681-10688.
- Williams, C. and T. M. Coltart. 1978. «Adipose tissue metabolism in pregnancy: the lipolytic effect of human placental lactogen». *Br J Obstet Gynaecol*, Vol. 85(1), p. 43-46.
- Wittmaack, F. M., M. E. Gafvels, M. Bronner, H. Matsuo, K. R. McCrae, J. E. Tomaszewski, S. L. Robinson, D. K. Strickland and J. F. Strauss, 3rd. 1995. «Localization and regulation of the human very low density lipoprotein/apolipoprotein-E receptor: trophoblast expression predicts a role for the receptor in placental lipid transport». *Endocrinology*, Vol. 136(1), p. 340-348.
- Wyne, K. L. and L. A. Woollett. 1998. «Transport of maternal LDL and HDL to the fetal membranes and placenta of the Golden Syrian hamster is mediated by receptor-dependent and receptor-independent processes». *J Lipid Res*, Vol. 39(3), p. 518-530.
- Xiong, S., S. S. Chirala, M. H. Hsu and S. J. Wakil. 1998. «Identification of thyroid hormone response elements in the human fatty acid synthase promoter». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 95(21), p. 12260-12265.
- Xu, J., M. Teran-Garcia, J. H. Park, M. T. Nakamura and S. D. Clarke. 2001. «Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-

- binding protein-1 expression by accelerating transcript decay». *J Biol Chem*, Vol. 276(13), p. 9800-9807.
- Yabe, D., M. S. Brown and J. L. Goldstein. 2002. «Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99(20), p. 12753-12758.
- Yabe, D., R. Komuro, G. Liang, J. L. Goldstein and M. S. Brown. 2003. «Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100(6), p. 3155-3160.
- Yancey, P. G., A. E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M. C. Phillips and G. H. Rothblat. 2003. «Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 23(5), p. 712-719.
- Zhang, Y., L. Yin and F. B. Hillgartner. 2003. «SREBP-1 integrates the actions of thyroid hormone, insulin, cAMP, and medium-chain fatty acids on ACC α transcription in hepatocytes». *J Lipid Res*, Vol. 44(2), p. 356-368.
- Zorzano, A. and E. Herrera. 1986. «Comparative utilization of glycerol and alanine as liver gluconeogenic substrates in the fed late pregnant rat». *Int J Biochem*, Vol. 18(7), p. 583-587.